

Untersuchungen am Adenovirus-Genom

Neuere Aspekte zur Replikation und zur spezifischen Mutagenese

Thomas Werner

Untersuchungen am Adenovirus-Genom

Neuere Aspekte zur Replikation und zur spezifischen Mutagenese

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von
Thomas Werner

am
20. Januar 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinen Eltern und Ruth

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1981 bis September 1985 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Prof. Winnacker danke ich für das Interesse und die Möglichkeiten zur Eigeninitiative in der Ausführung dieser Arbeit, sowie für die Unterstützung, die er mir persönlich zukommen ließ.

Herrn Dr. Ronald Mertz danke ich für die Synthese der verwendeten Oligonukleotide, ohne die Mutagenese und Sequenzierung in dieser Form nicht möglich gewesen wären.

Weiterhin gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere ist hier Herr Peter Heinrich zu nennen, der mich mit der Praxis der Doppelstrangsequenzierungs-Methode vertraut machte.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Adenoviren	1
1.2. DNA-Replikation von Adenoviren	1
1.3. Das terminale Protein von Adenoviren	4
1.4. Aspekte der Adenovirus-DNA-Replikation	5
1.5. Aufgabenstellung	6
2. Material	
2.1. Bakterienstämme, Plasmide, Viren und Zellen	7
2.2. Enzyme	7
2.3. Chemikalien und sonstige Materialien	8
3. Methoden	
3.1. Zellkulturen von HeLa-Zellen	
3.1.1. HeLa-Zellen in Monoschichtkulturen	10
3.1.2. HeLa-Zellen in Suspensionskultur	10
3.2. Viruszucht und Gewinnung aus HeLa-Zellen	
3.2.1. Viruszucht aus Monoschichtkulturen	11
3.2.2. Virusgewinnung aus Suspensionskulturen	12
3.2.3. Gewinnung von ^{14}C -markiertem Virus aus Monoschichtkulturen	12
3.3. Präparation viraler DNA	
3.3.1. Präparation von ^{14}C -markiertem DNA-Proteinkomplex	13

	Seite
3.3.2. Präparation von proteinfreier Ad2-DNA durch Proteinase K Behandlung	13
3.4. Präparation von Kernisolaten zur in vitro Replikation von Ad2-DNA	13
3.5. Transfektion von HeLa-Zellen mit Ad2-DNA	14
3.6. Plaque Test mit HeLa-Zellen	16
3.7. In vitro Replikation von Ad2-DNA mit isolierten Zellkernen	16
3.8. Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Antigene in HeLa-Zellen	17
3.9. CAT-Assay mit HeLa-Zellen zur Kontrolle der Transfektion	18
3.10. Enzymatisches Modifizieren von DNA	
3.10.1. Reinigung und Präzipitieren von DNA	20
3.10.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	21
3.10.3. Entfernen von 5'-Phosphaten mit alkalischer Phosphatase	22
3.10.4. Entfernung von unerwünschter RNA durch RNase-Behandlung	22
3.10.5. Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen mit T4-Polynukleotidkinase	23
3.10.6. 5'-Markierung von DNA durch Phosphataustausch mit T4-Polynukleotidkinase	24
3.10.7. Verknüpfung von DNA-Enden mit T4-DNA-Ligase	25
3.11. Charakterisieren von DNA	
3.11.1. Auftrennen von DNA auf Agarosegelen	26
3.11.2. Reinigung und Isolierung von Oligonukleotiden auf Polyacrylamid-Gelen	27
3.11.3. Southern-Blot-Technik	29
3.11.4. Sequenzanalyse nach Sanger	31
3.11.5. Sedimentation in Sucrosegredienten	33
3.11.6. TCA-Fällung von DNA	34
3.11.7. Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden	34

3.12. Bakterienkulturen	
3.12.1. Vermehren von Bakterien auf Agarplatten	35
3.12.2. Zucht von Bakterien in Flüssigkultur	35
3.12.3. Erzeugung transformationskompetenter Bakterienzellen	36
3.12.4. Transformation von kompetenten Bakterienzellen	36
3.12.5. Aufbewahrung von Bakterienstämmen	36
3.12.6. Koloniehybridisierung mit Oligonukleotiden	37
 3.13. Klonieren von DNA in E. coli Zellen	 38
 3.14. DNA-Isolierungen	
3.14.1. Plasmidisolierung durch Dichtegradienten-Zentrifugation	39
3.14.2. Plasmid Schnellpräparation	40
3.14.3. Phagenzucht und Plaque-Test von F1 und M13 Phagen	40
3.14.4. pEMBL-Einzelstrang Isolierung	42
3.14.5. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen durch direkte Elution	43
3.14.6. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen über Membranfilter	43
3.14.7. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen durch Elektro-Elution	44
 3.15. Oligonukleotid-abhängige DNA-Mutagenese	 45
 3.16. Computeranalysen	 46
 4. Ergebnisse	
 4.1. Einfluß von Ap ₄ A auf die [³ H]-dTTP Inkorporation	 47
4.1.1. Replikationskinetik mit HeLa-Zellen, die mit reduziertem Serum gezüchtet wurden	47
4.1.2. Reaktionskinetik unter dem Einfluß von Proteinbiosynthese-Inhibitoren	48
4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.1.1. und 4.1.2.	51
 4.2. Inkorporation und Degradation von Ap ₄ A	 53
4.2.1. Analytisches System zum Nachweis von Ap ₄ A in den Extrakten	53

4.2.2.	Inkorporation von ^3H -Aktivität aus Ap_4A in Ad2-DNA	55
4.2.3.	Vergleich infizierter und nichtinfizierter HeLa-Zellkerne	57
4.2.4.	Beeinflussung der Reaktionskinetik durch snake-venom-phosphodiesterase	58
4.3.	Eigenschaften von Typ III Restriktionsenzymen	60
4.3.1.	Spaltungscharakteristik von Hga I	61
4.3.2.	Abschätzung der Wiederholungshäufigkeit von überhängenden Endsequenzen	61
4.4.	Mutation im terminalen Protein von Ad2 (Fok-I-System)	65
4.4.1.	In vitro Religierung von Ad2-DNA aus Fok I Fragmenten	66
4.4.2.	Transfektion von HeLa-Zellen mit rekonstituierten Ad2 Fok I Fragmenten	69
4.4.3.	Auswahl der Mutation und Strategie der Mutagenese	71
4.4.4.	Subklonierung eines Ad2 Fragmentes in den Vektor pEMBL	74
4.4.5.	In vitro Mutagenese des Plasmids PJM 1	75
4.4.6.	Rekonstitution von Ad2 Fok I Fragmenten mit PJM 1 Eco	78
4.5.	Computer-Analyse von Ad2-DNA für Typ III Restriktionsenzyme	80
4.6.	Mutation von Ad2-DNA über die Bstx I Fragmente	
4.6.1.	Strategie des Bstx I Systems	82
4.6.2.	Konstruktion des Vektors pBstx aus pUC 12	84
4.6.3.	Klonierung des Ad2 Bstx I C Fragmentes und Einbau der Mutation aus pJM 1 Eco	85
4.6.4.	Rekonstitution von Gesamt Ad2-DNA mit dem Ad2 Bstx I Fragment aus pABCE	87
4.6.5.	Charakterisierung der aus den Bstx I Fragmenten erzeugten mutierten Ad2-DNA	87
4.6.6.	Transfektion von HeLa-Zellen mit der Ad2-DNA Mutante	91
4.7.	Sequenzierung der Mutation in PABCE	92

	Seite
5. Diskussion	
5.1. Der Ap ₄ A-Effekt auf die Adenovirus-DNA-Replikation	95
5.2. Rekonstitution des Adenovirusgenoms aus Restriktionsfragmenten	97
6. Zusammenfassung	105
7. Literatur	106

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 3.1. Standard-Bedingungen für in vitro Replikationsansatz	17
Tab. 3.2. Restriktionspuffer gemäß Maniatis (1982)	21
Tab. 3.3. Spaltungspuffer für Typ III Enzyme	21
Tab. 3.4. PAA-Gel 1,5 mm Dicke, 400 mm Länge, 200 mm Breite	27
Tab. 3.5. Extinktionsbestimmung für Oligonukleotide	29
Tab. 3.6. Lösungen zur Denaturierung und Primer-Bindung	31
Tab. 3.7. Reaktionsmischungen für Sequenzierungsreaktion nach Sanger	32
Tab. 3.8. Lösungen für die Fragmentisolierung mit DEAE- Membranen	44
Tab. 3.9. Vorbehandlung des Dialyseschlauches für die Elektro-Elution	45
Tab. 3.10. Lösungen für die Mutagenese nach Zoller and Smith (1982)	46
 Tab. 4.1. Typ III Restriktionsendonukleasen	 81
 Abb. 1.1. Modell der Adenovirus-DNA-Replikation nach Lechner und Kelly (1977)	 2
Abb. 1.2. Initiation der Replikation von Adenovirus-DNA (aus Challberg et al., 1980)	4
Abb. 3.1. Expressionsvektor für den CAT-Assay	19
Abb. 3.2. Ausschneiden von Oligonukleotiden unter UV-Licht	28
Abb. 3.3. Naßblot nach Southern (1975)	30
Abb. 3.4. Spacer-Anordnung für ein Keilgel	33

Abb. 3.5. Dünnschicht-chromatografische Trennung von Adenin-Nukleotiden und Ap_4A	34
Abb. 4.1. Kernkinetik mit Kernen aus Zellen, die mit 5% Serum kultiviert wurden	48
Abb. 4.2. Kernkinetik mit Cycloheximid-vorbehandelten Zellen (vier Stunden)	49
Abb. 4.3. Kernkinetik mit Cycloheximid-vorbehandelten Zellen (zwei Stunden)	50
Abb. 4.4. Alkalische Sucrose-Gradienten von Kernkinetiken	50
Abb. 4.5. Der Ap_4A -Effekt auf vorbehandelte Ad2-infizierte HeLa-Zellkerne	52
Abb. 4.6. Ap_4Ase -Aktivität zellulärer Fraktionen	54
Abb. 4.7. Nachweis von 3H -Aktivität in Ap_4A -Abbauprodukten	55
Abb. 4.8. Inkorporation von 3H -Aktivität aus Ap_4A (1 Ci/mmol) in Ad2-analog sedimentierendes Material	56
Abb. 4.9. Inkorporation von 3H -Aktivität aus Ap_4A (10 Ci/mmol) in Ad2-analog sedimentierendes Material	57
Abb. 4.10. Kinetiken unter Phosphodiesterase-Einwirkung	59
Abb. 4.11. DNA-Rekonstitution mit Typ III Restriktionsendonukleasen	64
Abb. 4.12. Religierung von Ad2 Fok I Fragmenten	67
Abb. 4.13. Religierung von Ad2 Hind III Fragmenten	68
Abb. 4.14. Ergebnisse der Transfektionen von HeLa-Zellen mit religierter Ad2-DNA	70
Abb. 4.15. Strategie der Klonierung und Mutagenese von pJM 1	73
Abb. 4.16. Das Plasmid pHB4 mit den wichtigsten Schnittstellen	74
Abb. 4.17. Radioaktive Markierungen von Koloniehybridisierungen mit Oligonukleotiden	76
Abb. 4.18. Southern-Blot von pJM 1 Eco	77
Abb. 4.19. Reassoziations von Ad2 Fok I Fragmenten mit der Mutante pJM 1 Eco	79
Abb. 4.20. Strategie zur Rekonstitution von Ad2-DNA aus den Bstx I Fragmenten	83
Abb. 4.21. Restriktions-Karten der Plasmide pJM 1 Eco, pABC und pABCE	86
Abb. 4.22. Reassoziations von Ad2 Bstx I Fragmenten mit der Mutante pABCE	88
Abb. 4.23. Restriktionsschnittstellen auf Ad2-DNA	90
Abb. 4.25. Sequenz und Orientierung des Primers TW 4	92
Abb. 5.1. Übersicht über die Sequenz der Mutante pABCE	100

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ad2	Adenovirus Typ 2
Ap ₄ A	Diadenosin- 5',5'''-P ¹ ,P ⁴ -Tetraphosphat
BP	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 * 10 ¹⁰ Becquerel)
cmp	gezählte Zerfälle pro Minute
dd NTP	2', 3'- Didesoxyribonukleosid-triphosphat
DDT	Dithiotreitol
EDTA	Tetraethylendiaminessigsäure
FITC	Fluorescein-isothiocyant
GF/C	Glasfilter Typ C
g/l	Gramm / Liter
HEPES	N- 2 Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hpi	Stunden nach der Infektion
k	Kilodalton
kb	tausend Basen
l	Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge 260 nm

VIII

PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-d	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
PEI	Polyethylenimin
pfu	Plaque bildende Einheit
pEMBL	Plasmid European Molecular Biology Laboratory
pUC	Plasmid University of California
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	10 mmol/l Tris/HCl pH 8,0, 1 mmol/l EDTA, Standard-Puffer
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
2x	zweimal

1. Einleitung

1.1. Adenoviren

Adenoviren sind hüllenlose DNA-Viren, mit ikosaedrischer Form (Exakte Beschreibung bei van Oostrum and Burnett, 1985) Ihr lineares doppelsträngiges DNA-Genom umfaßt $20 - 25 \times 10^6$ Dalton (Green et al., 1967) (exakte Genomgröße von Adenovirus Typ 2 : 35 937 Basenpaare). Damit sind sie unter die mittelgroßen Viren einzuordnen. Sie sind seit langem bekannt, die ersten Stämme wurden bereits vor 30 Jahren beschrieben (Rowe et al., 1953, Hilleman and Werner, 1954). Von den über 80 bekannten Serotypen sind über die Hälfte menschliche Viren. Sie verursachen Erkrankungen des Respirationstraktes und der Augen, zusätzlich besitzen zumindest einige Stämme onkogenes Potential.

Die Virusvermehrung und Ausreifung der neuen Virionen findet im Kern der infizierten Zelle statt, wobei der Infektionszyklus etwa 24 Stunden dauert und in zwei Phasen abläuft. Die frühe Phase umfaßt die ersten sechs Stunden nach der Infektion (frühe Transkription), in der die Zelle auf die virale DNA-Replikation vorbereitet wird.

In der anschließenden späten Phase werden die Strukturproteine exprimiert und dafür die zelluläre DNA-Replikation und Proteinsynthese unterdrückt. Statt dessen wird sehr effizient die virale DNA repliziert (5×10^5 Kopien pro Zelle).

1.2. DNA-Replikation von Adenoviren

Das Genom von Adenovirus trägt an beiden 5'-Termini ein kovalent verknüpft Protein (TP, 55 k). Die DNA besitzt umgekehrte terminale Repetitionen von ca. 100 Basenpaaren Länge, deren exakte Länge vom jeweiligen Serotyp abhängt, die aber alle untereinander eine starke Homologie zeigen (Tamanoi and Stillman, 1983, Fütterer and Winnacker, 1984).

Die Replikation kann von beiden Enden initiiert werden, wobei der neue Strang kontinuierlich in 5'-> 3'-Richtung synthetisiert wird (Abb 1.1., Typ I Form).

Modell der Adenovirus-DNA-Replikation nach Lechner und Kelly (1977)

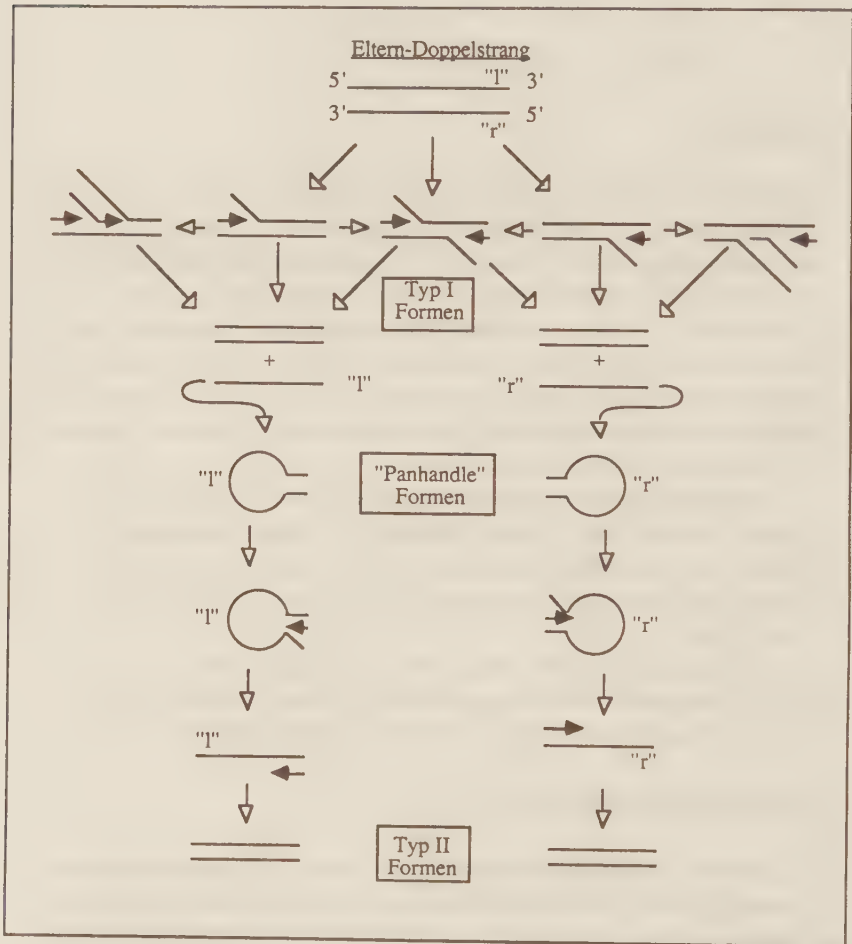


Abb 1.1.

Das Modell basiert auf elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Intermediaten (Typ I und Typ II). Genaue Erklärung des Modells im Text.

Im Zuge der Neusynthese wird ein Elternstrang verdrängt und kann selbst als Matrize für die Replikation dienen. Diese beginnt am 3'-Ende und verläuft von dort ebenfalls kontinuierlich zum 5'-Ende. Daraus resultiert wiederum ein intakter Doppelstrang mit der vollen Genomgröße. Die in der Mitte der Abb. 1.1. dargestellten Intermediate in Form einer Bratpfanne werden seit langem postuliert, sind aber bis jetzt noch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Sie weisen große strukturelle Ähnlichkeit mit der Typ I Initiation auf, weshalb sie durchaus möglich sind. Die beiden Intermediate vom Typ I und Typ II könnten direkt elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Initiation der DNA-Replikation

Die DNA-Replikation erfordert nach heutiger Kenntnis ein 3'-OH Ende als Primer. Da die Synthese unidirektional in 5' -> 3' Richtung verläuft, ist die Replikation linearer Genome problematisch. Adenoviren umgehen diese Schwierigkeiten nicht wie andere Viren durch die Bildung von Konkatermeren (Bakteriophage T7) oder "Haarnadel-Strukturen" (Parvoviren), sondern verwenden ein Protein als Primer (Rekosh et al., 1977, Rawlins et al., 1984, Reiter et al., 1980).

Der erste Schritt der Initiation besteht darin, daß ein Vorläufer des terminalen Proteins, der ca. 80 K groß ist (Smart and Stillman, 1982), in einer Matrizen-abhängigen Reaktion dCTP anlagert, wobei eine Phosphodiesterbindung zwischen einem Serinrest des Proteins und dem alpha-Phosphat des dCTP gebildet wird. Das Pyrophosphat wird durch die Ad-kodierte Polymerase (Ad-Pol), die diese Reaktion katalysiert und fest mit dem Vorläufer-Protein assoziiert ist, abgespalten und freigesetzt. Man kennt heute die erforderlichen strukturellen Voraussetzungen der DNA-Matrize sehr genau (Lally et al, 1984, Hay, 1985).

Beginnend von der freien 3'-OH-Gruppe des Cytosins kann die Elongation der DNA erfolgen, während der Elternstrang gleicher Polarität verdrängt wird. Das Protein bleibt kovalent an die DNA gebunden und wird im weiteren Verlauf der Infektion von einer viralen Protease zu der 55K Form des terminalen Proteins prozessiert, die in den Viruspartikeln zu finden ist. Dieses Protein nimmt damit eine Schlüsselrolle in der Replikation von Adenoviren ein (Abb. 1.2.).

Initiation der Replikation von Adenovirus-DNA (aus Challberg et al., 1980)

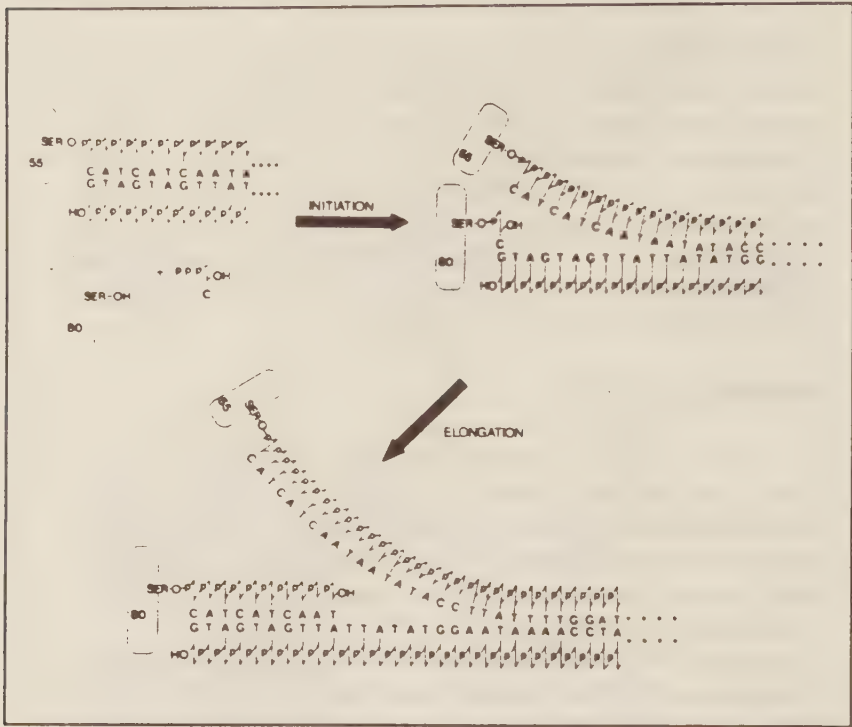


Abb. 1.2

Erklärung der Einzelschritte dieses Mechanismus im Text

1.3. Das terminale Protein von Adenoviren

Aufgrund der bekannten Sequenz von Adenovirus Typ 2 konnte das Gen für den Vorläufer exakt zugeordnet werden. Das ATG-Kodon befindet sich an der Position 10 534 (28,9%) und das Leseraster erstreckt sich bis zu einem TAG-Stoppkodon an der Position 8 575 (23,4%). Das Gen gehört zu der E2B Transkriptionseinheit von Adenovirus Typ 2 und ergibt nach der Translation ein Polypeptid von 74,6K Größe.

Durch einen Vergleich tryptischer Methionin-haltiger Peptide des authentischen Proteins mit den aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Peptiden konnte die Identität des Leserahmens mit dem terminalen Protein bestätigt werden (Smart and Stillman, 1982). Das reife 55K terminale Protein leitet sich von dem Carboxy-Terminus des Vorläufers ab.

Weitere Replikationsfaktoren

Außer den schon erwähnten beiden Proteinen ist noch ein drittes Virus-Protein für die Replikation erforderlich, das 72K DNA-bindende Protein. Es wird, wie die beiden anderen Proteine, während der frühen Phase der Infektion exprimiert. Zusätzlich sind noch mindestens zwei zelluläre Proteine zur effizienten Replikation von Adenovirus-DNA erforderlich. Der 47 K große Kernfaktor I und der Kernfaktor II, der Topoisomerase I Aktivität besitzt, werden gegenwärtig von verschiedenen Arbeitsgruppen analysiert (Chow and Pearson, 1985, Nowok et al., 1985).

Adenovirus gewinnt zunehmend als Vektorsystem an Bedeutung (Yamada et al., Harper et al., Van Doren, Grodzicker, zusammengefaßt in Annual Report 1984, Cold Spring Harbour Laboratory). Die Vielzahl der ausgearbeiteten Methoden zur Klonierung und Mutagenese von DNA unterliegen allerdings einem Größen-Limit bezüglich der DNA. Genome von der Größe von Adenovirus-DNA lassen sich zwar in günstigen Fällen klonieren (Hanahan und Gluzman, 1984), das Verfahren ist aber nicht allgemein anwendbar. Außerdem sind weitere Manipulationen, wie *in vitro* Punkt-Mutagenese nur in Subfragmenten möglich (de Vires et al., 1985).

1.4. Aspekte der Adenovirus-DNA-Replikation

Der genaue Ablauf der Adenovirus-DNA-Replikation ist im Hinblick auf die Vektorentwicklung ebenfalls von großer Bedeutung. Er läßt sich am besten über Mediatoren studieren, die in die Regulation eingreifen. Ein solcher Faktor ist das Diadenosin-5',5'''-P¹·P⁴-Tetraphosphat (Ap₄A), ein ungewöhnliches Dinukleotid, das in der Zelle vorkommt und durch etliche Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gebildet wird (Varshavsky, 1983).

Die eigentliche Rolle von Ap₄A ist noch immer ungeklärt, ebenso wie die Prinzipien seiner Regulation. Mehrere Autoren vertreten jedoch die Ansicht, daß es sich um ein "Alarmon" handelt (Bochner et al, 1984, Varshavsky 1983).

Ap₄A scheint in vielen Prozessen in der Zelle beteiligt zu sein: Seine Konzentration korreliert mit der effektiven Sauerstoffkonzentration (Bochner et al., 1984), es kann unter gewissen Bedingungen als Primer der DNA-Synthese dienen (Zamecnik et al., 1982) und inhibiert selektiv das viruskodierte pp60^{V-src}, nicht aber das zelluläre Analogon pp60^{c-src} (Barnekow, 1983). Außerdem übt es einen variablen Stimulationseffekt auf die Ad2-DNA-Replikation *in vitro* aus. (Werner, 1981, Reiter, 1980b).

Ap₄A kommt sowohl in Prokaryonten als auch in höheren Zellen vor und wird in beiden Zelltypen reguliert. Wenn ihm also eine Funktion zukommt, so muß diese hochkonserviert sein. Da es ubiquitär vorhanden ist, kann man seinen Einfluß nur in einem *in vitro* System untersuchen. Ein solches steht für Adenoviren in Form infizierter Zellkerne zur Verfügung.

1.5. Aufgabenstellung

Zunächst sollte in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der Adenovirus-DNA-Replikation und Ap₄A näher untersucht werden. Daraus sind eventuell Einblicke in die Verflechtung viruskodierter und zellulärer Funktionen möglich, die für das Verständnis viraler Infektionsmechanismen von Bedeutung sind.

Unabhängig davon sollte ein System entwickelt werden, das es gestattet, das vorhandene Repertoire an gentechnologischen Techniken auf die Genomgröße von Adenovirus zu übertragen.

Ziel des Verfahrens ist es, jede gewünschte Mutation, bis hin zu einzelnen Punktmutationen, definiert in eine beliebige Position des Adenovirus-Genoms bringen zu können. Damit verfügt man über ein ideales Instrument, um die viralen Funktionen selektiv zu manipulieren. Mittels eines solchen Systems, ließe sich nicht nur die Adenovirusinfektion und die virale Replikation untersuchen, sondern es würde auch die Konstruktion von Adenovirusvektoren erheblich vereinfachen.

2. Material

2.1. Bakterienstämme, Plasmide, Viren und Zellen

Die verwendeten Bakterienstämme E. coli HB 101, DH 1 und JM 103, die Plasmide pHB4, pUC 12 und pEMBL wurden von der Stammsammlung des Arbeitskreises Prof. Winnacker bereitgestellt. Aus der gleichen Quelle kamen die Phagen M13 mp8 und F1, sowie HeLa-Zellen und Adenovirus Typ 2 (Ad2).

2.2. Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach, Bethesda Research Laboratories GmbH, Neuhausen, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, sowie von Amersham-Buchler, Braunschweig geliefert.

Weitere Enzyme kamen von:

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Hühner-Lysozym, alkalische Phosphatase, Ribonuklease A, T4-DNA Ligase, Klenow Fragment der DNA-Polymerase I.

New England Biolabs, Schwalbach:

Klenow Fragment der DNA-Polymerase I, T4-Polynukleotidkinase.

E. Merck AG, Darmstadt:

Proteinase K aus Pilzen.

Die für die Mutagenese und die Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, bzw. am Genzentrum in Martinsried von Dr. Roland Mertz freundlicherweise synthetisiert.

2.3. Chemikalien und sonstige Materialien

Amersham-Buchler, Braunschweig:

[³²P] ATP (3000 Ci/mmol), [³⁵S] thio-dATP (650 Ci/mmol), [¹⁴C]-dTTP (Ci/mmol), Methyl-[³H]-Thymidin 5'-Triphosphat ([³H]-dTTP) (30 Ci/mmol).

I.T. Baker Chemical Co. Phillipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid (CsCl), Glycerol

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), 2'-Desoxyribonukleosid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Didesoxynukleosid-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), Chloramphenicol, Kalbsthymus-DNA, Lachssperma-DNA.

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Tryptone, Yeast-Extract.

Flow Laboratories, Bonn:

Gentamycin, newborn und foetales Kälberserum

Kodak Limited:

Röntgenfilme XAR-5, X-Omat S, D 19 Entwickler

E. Merck, Darmstadt:

Ammoniumperoxodisulfat, Borsäure, Bromphenolblau, 1-Butanol, Chloroform, Dimethylformamid, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylen-dinitrioloessigsäure (EDTA), Ethylether, Glycin, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydroxid (KOH), PEI DC Plastikfolien (PEI-Cellulose F), Lithiumchlorid (LiCl), Magnesiumchlorid (MgCl₂), Magnesiumsulfat (MgSO₄), Methanol, Natrium- acetat, Natriumchlorid (NaCl), Natriumcitrat, Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Natriumdodecylsulfat (SDS), Phenol, Polyethylenglycol 6000 Tetramethylethylendiamin (TEMED), Trichloressigsäure (TCA), Triton X-100, Xylencyanol, Zitronensäure.

Miles Laboratories:

FTTC-markierte Antiseren (Fluorescein-isothiocyanat)

Nunc GmbH, Wiesbaden:

Petrischalen, Zellkulturflaschen (Falconflaschen)

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

2',3'-Dideoxyribonukleosid-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

C. Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol (DTT).

Schleicher&Schüll, Dassel:

DEAE-Cellulose-Membran NA-45, Nitrocellulose-Filter BA-85

Serva, Heidelberg:

Acrylamid, silanisierte Glaswatte, Harnstoff, 2-Mercaptoethanol, N,N'-Methylen-bisacrylamid, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Trichlor-trifluorethan (Freon 113), Visking-Dialysesschläuche.

Sigma Chemie München:

Agarose, Ampicillin, Rinderserumalbumin (BSA), Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris).

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:

3 MM Papier, Anionenaustauscher DE-52, Glasfilter GF/C.

Zinser, Frankfurt:

Quickszint 501

Ap₄A (Natriumsalz) 2,8 [³H]-Ap₄A (30 Ci/mmol) war ein Geschenk von Dr. F. Grummt, Würzburg.

3. Methoden

3.1. Zellkulturen von HeLa-Zellen

3.1.1. HeLa-Zellen in Monoschichtkulturen

HeLa-Zellen wurden in Monoschichtkulturen in Kulturflaschen (Falcon) und in Petrischalen gezüchtet. Als Nährmedium wurde dabei Dulbecco's Medium (Dulbecco und Freeman, 1959) verwendet. Es wurde mit 10% Serum neugeborener Kälber (oder 5% foetalem Serum) komplementiert. Die Kulturgefäße wurden in einem CO₂-Luftgemisch (5% CO₂) bei 37° C inkubiert. Die Zellpassage erfolgte, wenn der Monolayer nahezu konfluent gewachsen war. Dazu wurde das Medium abgossen und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS-d (bei 37° C) mit 1 ml Trypsinlösung bei 37° C inkubiert. Sobald sich die Zellen durch leichtes Anstoßen der Kulturflasche ablösen ließen, wurden sie in Aliquots mit frischem Medium in neue Kulturgefäße überführt. Das Verdünnungsverhältnis betrug hierbei üblicherweise 1:4 oder 1:5.

3.1.2 HeLa-Zellen in Suspensionskultur

Der Übergang von der Monoschichtkultur zur Suspensionskultur erfolgte normalerweise mit der Zellmenge, die vier bis fünf Falconflaschen entspricht. Die Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben abgelöst und dann in 400 - 500 ml modifiziertes Eagle's Medium (Eagle, 1959) überführt. Es wurde gleichfalls mit 10% Serum neugeborener Kälber ergänzt. Als Kulturgefäß diente dabei ein 2 l fassender, luftdicht verschlossener Glasbehälter, der magnetisch gerührt werden konnte (Spinnergefäß). Dadurch wurde verhindert, daß sich die Zellen absetzten.

Nach zwei Tagen wurde das Volumen mit frischem Medium auf 1000 ml aufgefüllt und weitere zwei Tage bei 37° C inkubiert. Dann wurde neues Medium bis zum Endvolumen von 1800 ml zugegeben und weitere zwei Tage inkubiert. Nach dieser Zeit konnte der Spinner wie unter 3.2.2. beschrieben infiziert werden.

3.2. Viruszucht und Gewinnung aus HeLa-Zellen

3.2.1. Viruszucht aus Monoschichtkulturen

Zur Gewinnung von Adenovirus Typ 2 aus Monoschichtkulturen wurden Falconflaschen oder Petrischalen verwendet. Die halbkongfluenten Kulturen wurden zweimal mit PBS-d bei 37° C gewaschen und mit 1/5 des ursprünglichen Volumens Medium überschichtet. Dieses Medium enthielt kein Serum. Dazu kam 0,5 ml einer Suspension von Adenovirus Typ 2, die aus HeLa-Zellen als Rohlysat erhalten wurde (siehe 3.2.2).

Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde das virushaltige Medium abgegossen und durch die bei der Zellkultur übliche Menge frisches Medium ersetzt. Es enthielt diesmal aber nur 2% Serum neugeborener Kälber. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden bei 37° C weiterinkubiert und dann geerntet. Von Petrischalen ließen sich die Zellen mit einem sterilen Gummiwischer lösen. Dannach wurden sie in 1/80 Volumen 0,02 mol/l Tris aufgenommen.

Die Falconflaschen wurden sofort nach dem Abgießen des Mediums mit 1/80 Volumen 0,02 mol/l Tris versetzt und in waagrechter Position eingefroren (Der Zellrasen war von der Lösung vollständig bedeckt). Die Zellen ließen sich während des Auftauens dann leicht von der Unterlage losschütteln und mit einer Pipette aus der Flaconflasche entnehmen. Anschließend wurde die Zellsuspension durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen und direkt der Reinigung im CsCl Gradienten zugeführt.

CsCl-Gleichgewichtsgradient

Die Suspension wurde mit einem halben Volumen CsCl (in g) versetzt (Volumen = X ml, X/2 g CsCl) und in der Ultrazentrifuge (Sorvall UTD, Vertikalrotor TV 865) zwei Stunden bei 48 000 U/min und einer Temperatur von 4° C zentrifugiert. Die Viruspartikel bildeten ca. in der Mitte des Röhrchens eine (vor dunklem Hintergrund) gut sichtbare weiße Bande, die mit einer Pasteurpipette entnommen wurde. Die Gradientenreinigung wurde noch zweimal wiederholt und die resultierende Suspension anschließend 3x gegen BND-A Puffer (allgemeiner Dialyse-Puffer, P 3.0.) bei 4° C dialysiert. Das Endprodukt stellt eine gereinigte Virussuspension dar.

BND-A-Puffer: 10 mmol/l Tris/HCl pH 8,0
 5 mmol/l EDTA
 250 mmol/l NaCl

P 3.0.

3.2.2. Virusgewinnung aus Suspensionskulturen

Eine nach 3.1.2. gezüchtete Suspensionskultur wurde bei 800 U/min 15 min abzentrifugiert (20° C) und die Zellen in 1/5 Volumen Medium ohne Serum aufgenommen. Dabei ergab sich eine mittlere Zelldichte von $2-3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Es folgte eine Infektion mit Adenovirus Typ 2 (ca. 30 - 50 pfu/Zelle) und eine einstündige Inkubation bei 37° C. Anschließend wurde die Kultur mit Medium, das jetzt nur noch 2% Serum neugeborenen Kälber enthielt, auf ihr ursprüngliches Volumen aufgefüllt und 48 Stunden bei 37° C weiterinkubiert. Die Zellen wurden zur Virusgewinnung durch Zentrifugation (15 min, 1200 U/min, 4° C) geerntet und das Pellet in 10 ml 0,02 mol/l Tris aufgenommen.

Durch eine Ultraschallbehandlung ließ sich die Suspension aufschließen. Dazu wurde sie bei 0° C im Eisbad vorgekühlt und dann in diesem Kühlbad dreimal 30 Sekunden beschallt (Branson Sonifier, Stellung 4, 70 mA). Zwischen den einzelnen Behandlungen lag jeweils eine Pause von einer Minute.

Die Zellfragmente wurden danach von der Virussuspension in einer Christ-Tischzentrifuge (3000 U/min, 10 min) abgetrennt. Der Überstand stellt das Virusrohlysat dar und wurde entweder bei -80° C eingefroren (Infektions-stock) oder zu reinem Virus weiterverarbeitet.

Zur Reinigung wurde die Suspension 2x mit dem doppelten Volumen 1,1,2-Trichlor,Trifluorethan (Freon 113) extrahiert (Falls die Suspension nur mehr geringe Verunreinigungen enthielt, entfiel dieser Schritt). Danach erfolgte die Reinigung über CsCL Gleichgewichtsgradienten, wie unter 3.2.1. beschrieben. .

3.2.3. Gewinnung von ^{14}C -markiertem Virus aus Monoschichtkulturen

Die Zucht und Infektion erfolgte, wie unter 3.1.1 und 3.2.1 beschrieben, in Falconflaschen. Sechs Stunden nach der Infektion (6 hpi) wurden 100 μCi [^{14}C]-

Natrium-Formiat je Falconflasche zugegeben und weitere 42 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach wurde nach 3.2.1 reine Virussuspension gewonnen. Zur Kontrolle der Markierung wurde ein Aliquot der Suspension im Szintillationszähler gezählt.

3.3. Präparation viraler DNA

3.3.1. Präparation von ^{14}C -markiertem DNA-Proteinkomplex

300 µl Suspension nach 3.2.3 wurden mit 2,3 ml 8 mol/l Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) und zwei g CsCl versetzt. Die Lösung wurde mit 0,02 mol/l Tris auf 4,3 ml aufgefüllt und 18 Stunden bei 15° C und 47 000 U/min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend durch Austropfen geerntet und die Gipfel-Fractionen über eine Szintillationsmessung identifiziert und vereinigt. Sie wurden gegen BND-A Puffer 3x dialysiert (4° C) und dann bei 4° C aufbewahrt.

3.3.2. Präparation von proteinfreier Ad2-DNA durch Proteinase K Behandlung

Virussuspension nach 3.2.1. oder 3.2.2. wurde auf eine Endkonzentration von 0,5% SDS und 150 µg/ml Proteinase K eingestellt und zwei bis vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die anfangs trübe Lösung wurde dabei klar. Anschließend wurde zweimal mit Phenol extrahiert (mit TE gesättigt) und die DNA-Lösung 3x gegen BND-A Puffer bei 4° C dialysiert. Es resultierten Konzentrationen von 200 bis 400 µg Ad2-DNA / ml (bei 4° C aufbewahrt). Die Virus-DNA war unter diesen Bedingungen mindestens ein Jahr stabil (durch das Restriktionsmuster kontrolliert).

3.4. Präparation von Kernisolaten zur *in vitro* Ad2-DNA-Replikation

Die Präparation der Kerne aus Ad2-infizierten HeLa-Zellen orientierte sich hauptsächlich an der bei Chalberg und Kelly (1979) beschriebenen Methode. Zur Infektion, wie unter 3.2.2. beschrieben, wurde die Mutiplizität auf ca. 500 - 1000 pfu / Zelle erhöht, um einen möglichst synchronen Verlauf zu gewährleisten.

Eine Stunde nach dem Auffüllen des Mediums wurde noch 2 molare Hydroxymethylharnstofflösung bis zu einer Endkonzentration von 10 mmol/l hinzugegeben. 18 bis

20 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen durch zehnminütige Zentrifugation bei 1400 U/min und 4° C geerntet. Das sedimentierte Pellet wurde in 1/40 Volumen eiskaltem Iso-Hepes-Puffer resuspendiert und erneut durch Zentrifugation gesammelt. Dann wurden die Zellen in 1/60 Volumen Hypo-Hepes-Puffer (P 3.1.) aufgenommen und blieben 10 min bei 0° C im Eisbad stehen.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einem Dounce-Homogenisator, in dem die gequollenen Zellen durch ca. 20 Bewegungen des Kolbens aufgebrochen wurden. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Effizienz der Lyse überprüft und gegebenenfalls nachlysiert. Wenn sich in der Suspension kaum noch intakte Zellen befanden, wurde das Lysat in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt, mit einem Volumen 0,6 mol/l Sucrose versetzt und bei 4° C 10 min zentrifugiert (3000 U/min). Das Kernsediment wurde im gleichen Volumen Iso-Hepes-Puffer (P 3.1.) aufgenommen und erneut sedimentiert. Für die Experimente wurde das Kernsediment in 0,5 ml Iso-Hepes resuspendiert und sofort in die Versuche eingesetzt.

Hypo-Hepes Puffer:	10 mmol/l Hepes pH 7,5
	5 mmol/l KCl
	0,5 mmol/l MgCl ₂
	0,5 mmol/l DTT
Iso-Hepes-Puffer :	45 mmol/l Hepes pH 7,5
	5 mmol/l KCl
	0,5 mmol/l MgCl ₂
	0,5 mmol/l DTT
	0,22 mol/l Sucrose

P 3.1.

3.5. Transfektion von HeLa-Zellen mit Ad2-DNA

Das Verfahren der Transfektion ist im wesentlichen bei Sharp et al. (1976) beschrieben. Die Transfektion erfolgte in ca. 50% konfluenten Petrischalen. Vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium der Platten gegen ein gleiches Volumen neues Medium ausgetauscht, das anstelle des Serums neugeborener Kälber 10%

foetales Kälberserum enthält. Die DNA wurde zur Transfektion in einem Gemisch folgendermaßen vorbereitet: ca 10 µg DNA / 9cm Petrischale wurden mit 40 µl Kalbsthymus (1,5 mg/ml, siehe P 3.2.) oder Lachssperm-Carrier-DNA versetzt und gemischt. Dann erfolgte die Zugabe des 2 molaren CaCl_2 (63 µl) und das Volumen wurde mit TE auf 500 µl ergänzt. Parallel dazu wurden 500 µl 2x HBS (siehe P 3.2.) in einem sterilen Zentrifugentröhrchen mit Spitze vorgelegt. Die oben beschriebene DNA-Suspension wurde unter ständigem Mischen auf dem Vortex-Mixer langsam einpipettiert und die fertige Suspension 20 bis 30 min bei Raumtemperatur belassen. Dabei bildete sich ein feinstkristalliner Niederschlag, der die Lösung trübte.

Die DNA wurde auf die Platten verteilt; zuvor wurde deren Medien-Volumen auf jeweils 7 ml reduziert. Dann wurden die Schalen vier Stunden bei 37° C inkubiert und danach das Sediment im Phasenkontrastmikroskop überprüft.

Glycerinschock

Nach dem Absaugen des Mediums wurde jede Petrischale mit 3 ml 20% Glycerin in 1x HBS überschichtet. Nach drei Minuten Inkubation bei 37° C im CO_2 -Inkubator und einer Minute bei Raumtemperatur wurden je Platte 3 ml Dulbecco's Medium zugegeben und dann erneut abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend 2x mit Dulbecco's Medium gewaschen. Jede Platte erhielt 10 ml frisches Medium (10% foetales Serum). Dann wurde die Inkubation bei 37° C im CO_2 -Schrank fortgesetzt.

2 x HBS:

280 mmol/l NaCl

50 mmol/l Hepes

1,5 mmol/l Na_2HPO_4

auf pH 7, 15 einstellen mit 1 mol/l NaOH

Kalbsthymus Carrier-DNA:

15 mg DNA in 15 ml H_2O lösen, 3x

30 Sekunden mit Ultraschall behandeln

und zwei mal phenolisieren nach 3.10.1.

Dann 3x gegen TE dialysieren

Nach drei bis vier Tagen konnte durch Immunfluoreszenz oder Plaque-Test eine Infektion nachgewiesen werden. Um Virus aus den Transfektionen zu gewinnen, wurden die transfizierten Zellen einmal auf neuen Petrischalen vermehrt und dann zur Virusgewinnung aufgearbeitet.

3.6. Plaque Test mit HeLa-Zellen

HeLa-Monoschichtkulturen, die 80% konfluent waren (30 mm Petrischalen), wurden mit Virusverdünnungen (ca. 0,01 bis 1 pfu/Zelle) in Tris-gepufferter Salzlösung 50 min bei 37° C inkubiert (0,4 ml /Platte). Nach dieser Infektionszeit wurde abgesaugt und folgende Lösung aufgebracht: Dulbecco's Medium, das 0,8% Agarose, 5% Pferdeserum und 25 mmol/l $MgCl_2$ enthielt. Die erforderliche Gießtemperatur betrug ca. 43° C. Bis zum Festwerden der Agarose blieben die Zellen bei Raumtemperatur, danach wurden sie bei 37° C weiterinkubiert. Am 2. bzw. 3. oder 4. Tag wurden die Platten erneut mit Nährlösung überschichtet. Zur Analyse erfolgte eine letzte Überschichtung mit Nährlösung, die zusätzlich 0,01% Neutralrot enthielt. Ein bis zwei Tage danach konnten die gebildeten Plaques ausgezählt werden. Die angegebenen Ergebnisse bestimmen sich jeweils aus dem Mittelwert der gezählten Plaques eines Versuches.

3.7. In vitro Replikation von Ad2-DNA mit isolierten Zellkernen

Isolierte und mit Adenovirus Typ 2 infizierte Kerne aus HeLa-Zellen sind in der Lage, die Replikation der Virus-DNA *in vitro* fortzuführen. Ein entsprechender Ansatz ist bei Reiter (1980b) beschrieben. Die Versuche mit Ap₄A erfolgten in einem Standard-Test, der die in Tabelle 3.1. angegebenen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 50 - 500 µl enthielt.

Inkubiert wurde bei 37° C in einem Wasserbad, wobei das in den Versuchen eingesetzte Ap₄A jeweils vorher in das Reaktionsgefäß lyophilisiert wurde. Unter diesen Bedingungen blieb der Einbau von [³H]-dTTP in säurefällbares Material meist bis zu einer Stunde linear. Die Kinetik wurde durch Abstoppen von Aliquots ermittelt, die dazu in je 0,3 ml 3 mol/l NaOH einpipettiert wurden. Die Proben

wurden dann mit TCA gefällt (je Probe 3 ml 5% TCA, 30 min bei 0° C auf Eis stehen lassen) und die Niederschläge auf Whatman GF/C Filtern gesammelt. Nach dem Trocknen wurde zu jedem Filter 5 ml Quickszint gegeben und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

Standard-Bedingungen für in vitro Replikationsansatz

5 mmol/l $MgCl_2$
 25 mmol/l NaCl
 25 mmol/l KCl
 2 mmol/l EGTA
 2 mmol/l ATP
 4 mmol/l Phosphoenolpyruvat (PEP)
 10 µg/ml Pyruvatkinase
 je 60 µmol/l dGTP, dATP, dCTP
 10 µmol/l [3H] dTTP (spez. Aktivität 1mCi/mmol)
 40-400 µl Kernsuspension

Tabelle 3.1.

Die Überprüfung des gebildeten Materials erfolgte parallel durch die Sedimentation in einem alkalischen Sucrosegradienten (5%-20%, 50% Kissen, unter 3.11.5. beschrieben). Auf einen Gradienten von 4,3 ml Volumen wurden 10 µl des Reaktionsgemisches aufgebracht. Dazu kam eine entsprechende Menge an ^{14}C -markierter Ad2-DNA, dann wurde der Gradient 16 Stunden bei 4° C inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation in einem Ausschwing-Rotor (AH 650) in der Ultrazentrifuge (2 Stunden, 4° C, 48 000 U/min). Die Gradienten wurden durch Austropfen fraktioniert und wie oben beschrieben TCA-gefällt.

3.8. Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Antigene in HeLa-Zellen

Das Verfahren ist im wesentlichen bei Vogt (1969) beschrieben. Dazu wurden die Zellen in 30 mm durchmessenden Petrischalen auf einem sterilen Deckglas herangezogen (Eine konfluent gewachsene Falconflasche auf 30 Petrischalen). Wenn die Zellen ca. 75% konfluent waren (ein Tag), wurden sie nach 3.2.1 infiziert

oder nach 3.5. transfiziert. Zur Analyse wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3x mit eiskalter Tris-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und mit 3 ml absolutem Alkohol (auf -20° C vorgekühlt) überschichtet. Es schloß sich eine Kältebehandlung bei -80° C für mindestens 20 min an (teils Inkubation über Nacht). Die Ethanolschicht wurde abgesaugt und die Plättchen in neue Petrischalen transferiert.

Die Zellen wurden wieder 3x mit kalter Tris-Lösung gewaschen und nach dem Absaugen kurz an der Luft getrocknet. Jedes Plättchen wurde dann mit ca. 60 µl einer 20-fachen Verdünnung des Antiserums bedeckt und 30 bis 40 min bei 37° C im CO₂-Inkubator belassen.

Danach wurden sie wieder, wie oben beschrieben, gewaschen und erneut mit einem Antiserum inkubiert, diesmal mit einem FITC-markierten Anti-Kanninchen-Antikörper (FITC = Fluorescein-isothiocyanat). Nach der Inkubation (wie oben) wurden die Gläschen wieder gewaschen und dann mit der Zellschicht nach unten auf einem Objektträger fixiert. Als Bindemittel diente hierbei ein Tropfen Glycerin.

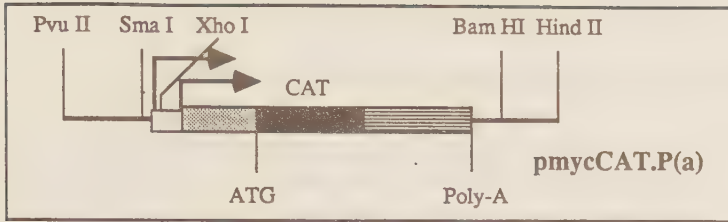
Bei 4° C und unter Lichtabschluß sind diese Präparate monatelang haltbar. Die gebildeten Foci wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem 25-fach vergrößernden Objektiv und einem 10-fach Okular betrachtet und ausgezählt. Dabei wurde ein Eichfeld angebracht, ausgemessen und die Ergebnisse jeweils auf das Deckgläschen umgerechnet.

Die Fotografien wurden auf einem 21-DIN-Film mit einer Belichtung von ca. 30 Sekunden bis zu 80 Sekunden aufgenommen.

3.9. CAT-Assay mit HeLa-Zellen zur Kontrolle der Transfektion

Der CAT-Assay ist bei Gorman et al. (1982) beschrieben. Petrischalen, die nach 3.5. transfiziert wurden, stellten das Ausgangsmaterial für den CAT-Assay (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Assay) dar. Dazu war der DNA-Mischung (wie unter 3.5. beschrieben) bei der Transfektion jeweils 10 µg des Plasmids pmycCAT-P(a) (Abb. 3.1.) zugegeben worden.

Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion 1x mit kaltem PBS-d gewaschen und je Platte 1 ml TEN (P 3.3.) zugegeben. Nach 5 min wurden die Zellen mittels eines sterilen Gummiwischers abgeschabt und mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Bei 4° C wurde das Pellet abzentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstandes trockengesaugt. Dann wurde es in 150 µl 0,25 mol/l Tris/HCl pH 7,8 aufgenommen und bei -80° C eingefroren.



Expressionsvektor für den CAT-Assay

Abb. 3.1.

Es bedeuten: Pfeile Transkriptionsstarts der myc RNA, schwarz: CAT-Strukturen, schraffiert Polyadenylierungssignal aus SV40. Das gesamte Konstrukt ist in einem pUC-Plasmid kloniert (das Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Martin Lipp zur Verfügung gestellt).

Nach dem Auftauen wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen, indem die Suspension 3x für 2 Sekunden im Eisbad beschallt wurde (Branson Sonifier, Stellung 4, jeweils eine Minute Pause). Dieses Lysat wurde noch 10 min bei 4° C inkubiert und dann in den CAT-Assay eingesetzt.

Dazu wurde der Extrakt mit 0,25 mol/l Tris/HCl pH 7,8 auf ein Volumen von 150 µl gebracht und dann 20 µl Acetyl-Coenzym A (4 mmol/l), sowie 1,5 µl [¹⁴C]-Chloramphenicol (wie bezogen eingesetzt) zugegeben.

Der Ansatz wurde 60 min bei 37° C inkubiert und dann mit 400 µl kaltem Ethylaceton (Eisbad) extrahiert. Die obere Phase (nichtwässrig) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Extraktion ein zweites Mal wiederholt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und in ca. 30 min im Speed-Vac-Gerät lyophilisiert. Anschließend wurde das Pellet in 15 µl Ethylaceton aufgenommen und auf DC-Platten aufgetragen (ca. 5µl Aliquots). Das Laufmittel für die Chromatographie ist in P 3.3. angegeben.

TEN :	40 mmol/l Tris/HCl pH 7,5	Laufmittel für DC-Analyse:
	1 mmol/l EDTA	95 % Chloroform
	150 mmol/l NaCl	5 % Methanol

3.10. Enzymatisches Modifizieren von DNA

3.10.1. Reinigung und Präzipitieren von DNA

Um den ungestörten und reproduzierbaren Ablauf enzymatischer Reaktionen mit DNA zu gewährleisten, müssen vorher alle störenden Verunreinigungen, insbesondere Nukleasen, entfernt werden. Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem gleichen Volumen TE-gesättigten Phenols (1 + 4) versetzt und beide Phasen gut gemischt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation, entweder in einer Eppendorf- oder einer Christ-Tischzentrifuge (falls die Volumina größer waren). Die obere Phase (wässrig) enthielt die DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt. Dort wurde der Vorgang der Phenolisierung wiederholt. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und dreimal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die Reste von Chloroform und Phenol durch dreimalige Extraktion mit Diethylether vollständig entfernt. Der restliche Ether wurde im Wasserbad durch 10 min Inkubation bei 50° C abgedampft.

Die so erhaltene DNA-Lösung konnte allen enzymatischen Behandlungen erfolgreich unterworfen werden, es waren keine weiteren Reinigungsschritte erforderlich.

Ethanolfällung

Die Präzipitation von DNA aus wässriger Lösung erfolgte durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 mol/l Natriumacetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol. Das Gefäß wurde anschließend bei -20° C über Nacht oder bei -80 °C für ca. eine Stunde inkubiert. Die gefällte DNA wurde dann durch Zentrifugation bei 4° C (20 min bei 15 000 U/min) gesammelt und das Pellet (bei kleineren DNA-Mengen unsichtbar) mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet im Speed-Vac-Apparat getrocknet (15 min) und danach der gewünschten Konzentration entsprechend in einem Puffer gelöst.

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Bei 260 nm entspricht eine OD einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (20 OD = 1 mg/ml, Maniatis et al, 1982), wenn gegen den Puffer gemessen wird, in dem die DNA gelöst ist.

3.10.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA wurde üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei einer Konzentration von 100 bis 200 µg/ml gespalten. Die erforderlichen Salzbedingungen wurden dabei mit Hilfe von 5x Puffern erreicht.

Gemäß der von Maniatis et al. (1982) aufgestellten Einteilung (Tabelle 3.2.) der Enzyme in drei Klassen mit verschiedenem Bedarf hinsichtlich der Ionenstärken, wurden die meisten Restriktionsverdauungen mit einem der drei Standardpuffer durchgeführt.

Puffer	NaCl	Tris/HCl pH 7,5	MgCl ₂	DTT
"niedrig"	-	10 mmol/l	10 mmol/l	1 mmol/l
"mittel"	50 mmol/l	10 mmol/l	10 mmol/l	1 mmol/l
"hoch"	100 mmol/l	10 mmol/l	10 mmol/l	1 mmol/l

Restriktionspuffer gemäß Maniatis (1982)

Tabelle 3.2.

Die Restriktionsverdauungen mit den Typ III Enzymen wurden ausschließlich mit den von den Herstellern angegebenen Spaltungspuffern durchgeführt:

<u>Spaltungspuffer für Typ III Enzyme</u>			
Enzym:	Bstx I	Fok I	Hga I
NaCl	150 mmol/l	-	50 mmol/l
MgCl ₂	6 mmol/l	10 mmol/l	6 mmol/l
2-Mercapto-Ethanol	-	6 mmol/l	6 mmol/l
DTT	1,0 mmol/l	-	-
KCl	-	20 mmol/l	-

Tabelle 3.3.

Pro Reaktionsansatz wurden zwischen einer und zehn Einheiten nach den Angaben des Herstellers eingesetzt und bei der für das Enzym vorgesehenen Tempera-

tur inkubiert. Die Spaltung wurde anschließend entweder durch Phenolisierung nach 3.10.1. oder durch Zugabe von 0,1 Volumen 10 x Stopppuffer beendet.

10 x Stopppuffer:	0,25% Bromphenolblau
	0,25% Xylencyanol
	100 mmol/l EDTA
	50 % Glycerin

P 3.4.

3.10.3. Entfernen von 5'-Phosphaten mit alkalischer Phosphatase

Restriktionsenzyme spalten die Phosphodiesterbindung asymmetrisch, so daß ein 3'-OH und ein 5'-Phosphorsäuremonoester-Ende (5'-Phosphat) entstehen. Dieses Phosphat kann nach vorheriger Abspaltung durch einen radioaktiv markierten Phosphat-Rest ersetzt werden, bzw. ist zur Verknüpfung von DNA-Stücken durch die DNA-Ligasen erforderlich (Seine Abspaltung kann also unerwünschte Verbindungen verhindern).

Die 5'-Phosphatgruppe wurde mit alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm abgespalten. Dazu wurde die DNA im direkten Anschluß an die Restriktionsspaltung mit 1/20 Volumen 20x RAP-Puffer (P 3.5.) versetzt und mit einer Einheit alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37° C weiterinkubiert. Da alkalische Phosphatase alle weiteren Reaktionen stören würde, mußte sie in jedem Fall durch Phenolisierung nach 3.10.1. entfernt werden.

20 x RAP-Puffer :	800 mmol/l Tris/HCl pH 8,0
	100 mmol/l MgCl ₂
	2 mmol/l ZnCl ₂

P 3.5.

3.10.4. Entfernung von unerwünschter RNA durch RNase-Behandlung

Isoliert man Plasmid-DNA aus Bakterien, lassen sich Verunreinigungen durch bakterielle RNA nicht verhindern. Diese können in einer Gelelektrophorese kleinere

Fragmente vollständig überdecken. Die RNA stört die Konzentrationsbestimmung und enzymatische Reaktionen der DNA (radioaktive Markierungen oder Ligase-reaktionen), deshalb muß sie entfernt werden. Eine Möglichkeit hierzu bietet die Behandlung der Probe mit RNase.

Die RNase A wurde 10 min bei 100° C gekocht (Entfernung, bzw. Inaktivierung eventuell vorhandener DNase-Aktivitäten) und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Von dieser Lösung (10 mg/ml in 50 mmol/l Natriumacetat pH 5,0) wurden 0,1 Volumen zu der DNA-Probe gegeben und 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend folgte eine Phenolextraktion wie unter 3.10.1. beschrieben.

3.10.5. Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen mit T4-Polynukleotidkinase

Diese Reaktion erfordert unterschiedliche Bedingungen, je nachdem, in welcher Form das 5'-OH vorliegt.

Hervorstehende 5'-Enden wurden mit ca. 30 pmol Enden / 10 µl eingesetzt. Dabei kam der Kinase 10x Puffer I (P 3.6.) zur Anwendung. Die Reaktion wurde bei 37° C in Anwesenheit einiger Einheiten T4-Polynukleotidkinase für 30 min durchgeführt und dann durch zehnminütiges Erhitzen auf 65° C gestoppt.

Kinase 10 x Puffer I:	Kinase 10 x Puffer II:
700 mmol/l Tris/HCl pH 7,6	500 mmol/l Tris/HCl pH 9,5
100 mmol/l MgCl ₂	100 mmol/l MgCl ₂
50 mmol/l DTT	50 mmol/l DTT
	50 % Glycerin

P 3.6.

Oligonukleotid-Markierung

Oligonukleotide wurden mit dem Kinase 10x Puffer II (P 3.6.) in 10 µl Gesamtvolumen bei einer Konzentration von 2 nmol/l (20 pmol pro Ansatz) ebenfalls 30 min bei 37° C inkubiert und dann durch Erhitzen auf 65° C gestoppt.

Das überschüssige ATP wurde bei phosphorylierter DNA durch Behandlung nach 3.10.1. (Phenolisieren und Ethanol-fällung) abgetrennt, im Falle der markierten Oligonukleotide durch die Verwendung von Ionenaustauschersäulen:

Abtrennung von ATP

Dazu wurde der Kinaseansatz mit TE auf 50 µl verdünnt und auf eine DE-52 (Whatman) Austauschersäule mit einem Bettvolumen von 0,5 ml aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit TEN 1 (P 3.7.) äquilibriert, womit auch das ATP in vier Portionen eluiert wurde. Die Abnahme der Aktivität in den Waschfraktionen wurde mit einem Geigerzähler verfolgt. Das noch an den Austauscher gebundene Oligonukleotid wurde anschließend mit 2x 0,5 ml TEN 2 (P 3.7.) eluiert und das vereinigte Eluat konnte direkt als Hybridisierungsprobe eingesetzt werden. Der gesamte Vorgang der Reinigung des Oligonukleotids erfolgte durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge. Die Säule war zu diesem Zweck in einer 1ml Spritze gepackt worden und steckte in einem Plastikzentrifugenröhrchen.

TEN 1:	1 mmol/l EDTA	TEN 2:	1 mmol/l EDTA
	0,2 mol/l NaCl		0,5 mol/l NaCl
	10 mmol/l Tris/HCl pH 8		10 mmol/l Tris/HCl pH 8

P 3.7.

3.10.6. 5'-Markierung von DNA durch Phosphataustausch mit T4-Polynukleotidkinase

Das Enzym arbeitet in einem reversiblen Gleichgewicht, was man zu einer direkten Markierung unter Umgehung der alkalischen Phosphatase ausnützen kann. Dazu wird dem Enzym in der Reaktion (Ablauf wie 3.10.5.) auch ADP (Reaktionspuffer siehe P 3.8.) angeboten, wodurch es zu einem Austausch des Phosphat-Restes zwischen dem 5'-Phosphat, ATP und ADP kommt. Dabei gelangt auch radioaktiv markiertes Phosphat an die 5'-Position der DNA. Die erreichbaren spezifischen Aktivitäten sind allerdings nicht so hoch, wie nach vorheriger Dephosphorylierung, weshalb dieses Verfahren nur eingesetzt wurde, wenn die markierten Fragmente anschließend ligiert werden sollten.

10 x 5'-Austausch-Puffer :	0,5 mol/l Imidazol/HCl pH 6,6
	0,1 mol/l MgCl ₂
	1 mmol/l Spermidin
	1 mmol/l EDTA
	steril filtrieren

P 3.8.

3.10.7. Verknüpfung von DNA-Enden mit T4-DNA-Ligase

Hier muß prinzipiell zwischen zwei verschiedenen Verfahren unterschieden werden. Zum Einen ist die Ligasereaktion erforderlich, um eine "fremde" DNA in einem Bakterium klonieren zu können. Sie muß dazu mit dem Vektor kovalent verknüpft werden, was üblicherweise in einem Volumen von 10 - 20 µl erfolgt. Dabei bildete der 10 x Ligasepuffer (P 3.9.) die Grundlage, die Vektor-DNA wurde in Mengen von 50 ng bis zu 1 µg eingesetzt. Die zu klonierende DNA wurde in Abhängigkeit von der Klonierungsart (eine Schnittstelle, zwei verschiedene Schnittstellen, Größe im Vergleich zum Vektor) dosiert. Das molare Verhältnis "fremde" DNA : Vektor betrug zwischen 1:1 und 5:1. Die Reaktion fand bei 16° C statt, erforderte ca. 5 Einheiten T4-DNA-Ligase und erstreckte sich über einen Zeitraum zwischen zehn und zwanzig Stunden.

10 x Ligase-Puffer:	500 mmol/l Tris/HCl pH 7,8
	100 mmol/l MgCl ₂
	200 mmol/l DTT
	10 mmol/l ATP

P 3.9.

Gänzlich anders wurde bei den Rekonstitutionsversuchen mit Typ III Restriktionsenzymen vorgegangen. Hier kam es in erster Linie darauf an, daß sich die Fragmente in der richtigen Reihenfolge anordnen, und daß es zu keinem vorzeitigen Abbruch der Reaktion kommt. Für diesen Fall hat sich ein größeres Gesamtvolumen

(100 µl) bewahrt, da es augenscheinlich die Stabilität der Komponenten erhöht. Die Reaktionszeit betrug immer mehrere Tage, die DNA-Menge entsprach typischerweise 10 µg (Gesamt-DNA) / 100 µl. Es wurde pro Ansatz die doppelte bis dreifache Menge Enzym eingesetzt, wie bei der bakteriellen Klonierung (siehe oben).

3.11. Charakterisieren von DNA

3.11.1. Auftrennen von DNA auf Agarosegelen

Agarosegele wurden sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt. Nahezu ausschließlich kamen dabei Gele mit einem Agarosegehalt von 1% zur Anwendung. Die Agarose wurde als Feststoff in den Gel-Puffer (1x Agarose-Gel-Puffer, P 3.10.) eingewogen und in diesem mit Hilfe eines Mikrowellenherdes gelöst. Danach wurde die Gellösung in einem Wasserbad auf 60° C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt (Stammlösung 10 mg/ml). Danach wurde das Gel entweder in eine vorbereitete Flachgelapparatur oder zwischen zwei Glasplatten gegossen (für vertikale Gele). Die anschließende Elektrophorese wurde bei einem Spannungsgradienten von ca. 3 V/cm durchgeführt. Der Auftragspuffer für die DNA-Proben ist mit dem 10 x Stoppuffer (P 3.4.) identisch. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde die DNA im Durchlicht mit einer UV-Lampe bei 254 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und direkt mit einer Polaroidkamera mit Rotfilter fotografiert.

Als besonders gut geeignet erwiesen sich Miniaturgele (BRL Apparatur Modell H6 "Babygel"). Sie waren bei der analytischen und präparativen Arbeit sehr nützlich, da sie nicht nur die erforderliche DNA-Menge senkten, sondern durch ihre kurze Laufzeit (30 bis 60 min) auch Zwischenkontrollen laufender Experimente erlaubten. Sie wurden ebenfalls in dem Agarose-Gel-Puffer (P 3.10) gegossen und elektrophoretisiert.

30 x Agarose-Gelpuffer:	1,2 mol/l Tris/Acetat pH 7,5
	150 mmol/l Natriumacetat
	30 mmol/l EDTA

P 3.10.

3.11.2. Reinigung und Isolierung von Oligonukleotiden auf Polyacrylamid-Gelen

Oligonukleotide, wie sie von dem DNA-Synthesizer geliefert werden, stellen ein Rohprodukt dar, in dem sich noch unvollständig synthetisierte Ketten und Abbruchprodukte befinden, die entfernt werden müssen. Das kann über eine präparative Elektrophorese in einem 16% PAA-Gel erfolgen. Die zu diesem Zweck verwendeten Gele waren 400 mm lang und 1,5 mm dick. Sie wurden wie folgt hergestellt:

16% PAA-Gel 1,5 mm Dicke, 400 mm Länge, 200 mm Breite	
75 g Harnstoff	} bei 37 °C Lösen, auf RT abkühlen und entgasen
60 ml Acrylamidlösung (38% Acrylamid, 2% N,N'Methylenbisacrylamid)	
15 ml 10 x TEB	
20 ml H ₂ O	
50 mg Ammoniumperoxodisulfat	
30 µl TEMED	

Tabelle 3.4.

Die in der Tabelle 3.4. angegebene Menge Harnstoff wurde in eine Saugflasche (500 ml) eingewogen, mit den aufgeführten Lösungen versetzt und entgast. Danach wurden 30 µl TEMED zugegeben und das Gel sofort nach dem Umschwenken zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach dem Einsetzen des Kammes erfolgte die Polymerisation für mindestens zwei Stunden, meist über Nacht.

Die Probe des Oligonukleotids wurde vor dem Auftragen auf das Gel vorbehandelt: 40 µl des Rohproduktes (ca. 10 OD) wurden lyophilisiert und danach wieder in 10 µl einer 1:1 Mischung aus H₂O und Dimethylformamid aufgenommen. Dazu kam noch 1 µl Auftragspuffer (P 3.11.), dann wurde die Probe für zwei Minuten auf 90° C im Wasserbad erhitzt. Anschließend kam sie ins Eisbad und wurde auf 0° C heruntergekühlt (5 min).

Jetzt konnte sie auf das Gel aufgetragen werden, dessen 30 min dauernder Vorlauf mit einem Spannungsgradienten von ca. 23 Volt / cm damit beendet wurde. Die

Elektrophorese erfolgte unter den gleichen Bedingungen in 1x TEB. Die durchschnittliche Laufzeit betrug dabei zwischen sechs und sieben Stunden. Anfangs wurden die Gele in der Aparatur mit einem Wasserbad auf 55° C thermostatisiert; dieses Verfahren erwies sich aber später als verzichtbar.

Auftragspuffer :	50 mmol/l EDTA
	50% Dimethylformamid
	0,25% Bromphenolblau
	0,25% Xylencyanolblau

P 3.11.

Um die Oligonukleotide aus dem Gel zu isolieren, wurde zunächst die obere Glasplatte (mit der Aussparung für den Kamm) vorsichtig abgenommen und durch eine Haushaltsfolie ersetzt. Auf diese Folie wurden zwei Fluoreszenzplatten gelegt (DC Platten mit Fluoreszenzfarbstoff, mit der beschichteten Seite nach unten zum Gel gerichtet). Darauf kam zur mechanischen Stabilisierung die abgenommene Glasplatte und das ganze Paket wurde umgedreht, so daß jetzt die rückwärtige Platte abgenommen werden konnte. Das nun frei liegende Gel (Abb. 3.2.) wurde im Auflicht bei 254 nm betrachtet. Dabei sind die Oligonukleotide durch ihre Fluoreszenz-auslöschung als schwarze Schatten gut erkennbar.

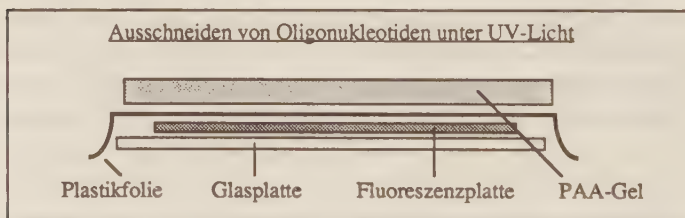


Abb. 3.2.

Die oberste Bande, die dem gewünschten vollständigen Produkt entspricht, wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in eine blaue 1000 µl Pipettenspitze (Eppendorf) überführt. Diese war zuvor an der Spitze zugeschmolzen und mit silanisierter Glaswatte gestopft worden. In dieser Spitze erfolgte die

mechanische Zerkleinerung der Gelstücke, bevor 800 µl H₂O zugesetzt und das Ganze mit Parafilm verschlossen wurde (Maxam und Gilbert, 1980). Diese Anordnung wurde über Nacht bei 37° C geschüttelt. Dann wurde die zugeschmolzene Spitze entfernt und das Eluat des Gelbreies durch die Glaswatte hindurch in ein Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Die Glaswatte verhinderte dabei, daß Teile des Polyacrylamids mit in das Eluat gelangen konnten. Mit 2x 200 µl H₂O wurde noch nachgewaschen und die wässrigen Phasen vereinigt.

Es folgte eine Ethanolfällung, die für Oligonukleotide etwas modifiziert wurde: Neben 0,11 Vol 3 mol/l Natriumacetat wurde noch 0,11 Vol 1 mol/l MgCl₂ zugegeben, dazu wiederum 2,5 Volumina absoluter Ethanol. Die Fällung erfolgte bei -80° C über Nacht. Dann wurde das Präzipitat bei 19 000 U/min gesammelt (4° C, 50 min, Sorvall SS34). Das so erhaltene Pellet wurde nach dem Trocknen im Speedvac (15 min) in 500 µl H₂O aufgenommen und bei 260 nm gegen H₂O im Photometer gemessen. Aus der optischen Dichte kann die Konzentration mit den in Tabelle 3.5. angegebenen Koeffizienten abgeleitet werden (Boehringer, 1973). Dabei wird die Summe der Werte für die einzelnen Nukleotide berechnet: Das Pentanukleotid GACTG ergäbe: $2 \cdot 11,8 + 15,0 + 7,4 + 8,8 = 54,8$ OD für 1 µmol/ml.

Extinktions-Koeffizienten für 260 nm und 1 µmol/ml:			
dT	dG	dA	dC
8,8	11,8	15,0	7,4

Extinktionsbestimmung für Oligonukleotide Tabelle 3.5.

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die Lösung erneut lyophilisiert und in der berechneten Menge H₂O aufgenommen, so daß sich eine Endkonzentration von 4 nmol/ml ergab. Das so erhaltene gereinigte Oligonukleotid wurde dann für die weiteren Versuche (5'-Phosphorylierung) eingesetzt.

3.11.3. Southern-Blot-Technik

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden für spätere Hybridisierungsexperimente auf Nitrocellulose-Filter übertragen (Southern 1975). Dazu ist es erforderlich, die DNA zu denaturieren, wozu das Gel zunächst eine Stunde in Denaturierungspuffer

geschwenkt (siehe P 3.12.) und dann in die Neutralisierungslösung überführt wurde. Dort wurde es wiederum für eine Stunde bewegt, dann war es bereit für den Transfer der DNA-Fragmente.

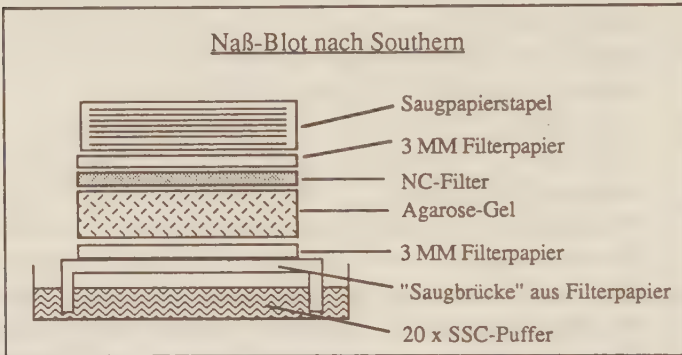


Abb. 3.3.

Dabei wurde das Gel, wie in der Abb. 3.3. zu sehen ist, mit einem Nitrocellulose-Filter passender Größe abgedeckt und dann in der gezeigten Anordnung 20 X SSC (P 3.12.) mittels des Kapillareffektes durchgesaugt. Das Filter wird vor dem Auflegen auf einer Wasseroberfläche benetzt und dann ohne Luftblasen auf das Gel gelegt. Die 3 MM Filterpapiere wurden vor der Verwendung mit 20 x SSC saturiert. Während des folgenden Transfers, typischerweise über Nacht, überführt das Lösungsmittel die Fragmente aus dem Gel auf das Filter.

Vor dem Abnehmen des Nitrocellulose-Filters vom Gel wurden die einzelnen Spuren des Gels auf dem Filter markiert und beschriftet. Dann wurde es kurz in dest. Wasser gespült und bei 80 °C zwei Stunden lang gebacken. Danach war das Filter bereit für die Hybridisierung und wurde in einer Plastikhülle aufbewahrt.

Denaturierungspuffer:	Neutralisierungslösung:	1 x SSC :
0,5 mol/l NaOH	0,5 mol/l Tris/HCl pH 5,5	0,15 mol/l NaCl
0,15 mol/l NaCl	0,15 mol/l NaCl	15 mmol/l Natriumcitrat

3.11.4. Sequenzanalyse nach Sanger

Ursprünglich wurde das Verfahren von Sanger (1977) für die enzymatische Synthese an Einzelsträngen entwickelt. Wie aber von Wallace et al. (1981b) gezeigt werden konnte, eignet sich auch doppelsträngige Plasmid-DNA als Template, falls geeignete synthetische Oligonukleotid-Primer zur Verfügung stehen. Der große Vorteil gegenüber dem Verfahren von Maxam und Gilbert (1980) besteht darin, daß weder aufwendige Markierungsreaktionen erforderlich sind, noch die Sequenzierung von bestimmten Restriktionsstellen abhängig ist. Dies bietet beste Voraussetzungen für ein schnelles Vorgehen.

Die Sequenzierungen wurden prinzipiell nach dem bei Chen und Seeburg (1985) beschriebenen Verfahren durchgeführt, also direkt aus dem Plasmid sequenziert. Dazu mußte die DNA zuerst denaturiert werden; 2 µg DNA wurden lyophilisiert und in 20 µl Denaturierungspuffer (Tabelle 3.6.) aufgenommen. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Neutralisierung mit 2 µl Acetatpuffer 2 und eine Ethanol-fällung durch Zugabe von 55 µl (2,5 Volumen) Ethanol. Nachdem das Pellet abzentrifugiert worden war (20 min, 13 000 U/min in Eppendorfzentrifuge, 4 °C), wurde es noch kurz im Speedvac getrocknet und konnte dann in die Sequenzierungsreaktionen eingesetzt werden.

Denaturierungspuffer:	10 x Annealing-Puffer:
0,2 mol/l NaOH	0,5 mol/l NaCl
0,2 mmol/l EDTA	70 mmol/l MgCl ₂
	70 mmol/l Tris/HCl pH 7,5
Acetatpuffer 2:	
2 mol/l Ammoniumacetat pH 4,8	Primer-Konz.: 4 nmol/ml

Lösungen zur Denaturierung und Primer-Bindung

Tabelle 3.6.

Dazu wurde es in einem Gesamtvolumen von 15 µl zusammen mit 10 pmol Primer, 1,5 µl 10 x Annealing-Puffer (Tabelle 3.6.) und 2 µl [³⁵S]-dATP (8 µCi/µl, 650 Ci/mmol) aufgenommen und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem der Primer an die DNA gebunden hatte, wurden 2 u Klenow Fragment der DNA-Poly-

merase zugegeben und durchmischt. Der Ansatz wurde dann in Aliquots zu je 3 µl aufgeteilt, die in vorbereitete Eppendorfgläser mit je 2 µl der Reaktionsmischungen für die einzelnen Nukleotide (Tabelle 3.7.) überführt wurden.

Die Reaktion wurde 20 min bei 30 °C durchgeführt, dann je 1 µl Chase-Mix (0,125 mmol/l aller dNTP's) zugegeben und die Inkubation weitere 15 min fortgesetzt. Danach wurden die Ansätze in einem Exsiccator getrocknet und in je 5 µl Auftragspuffer gelöst. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min auf 90 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Pro Gelspur wurde ca. 1 µl aufgetragen.

Reaktionsmischungen für Sequenzierungsreaktionen nach Sanger				
Konzentrationen der einzelnen Komponenten in den Ansätzen				
Nukleotid	A-Reaktion	G-Reaktion	C-Reaktion	T-Reaktion
dGTP	100 µmol/l	5 µmol/l	100 µmol/l	100 µmol/l
dCTP	100 µmol/l	100 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
dTTP	100 µmol/l	100 µmol/l	100 µmol/l	5 µmol/l
ddNTP	100 µmol/l	120 µmol/l	100 µmol/l	500 µmol/l
10xPuffer	1x	1x	1x	1x
Endvol.	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Tabelle 3.7.

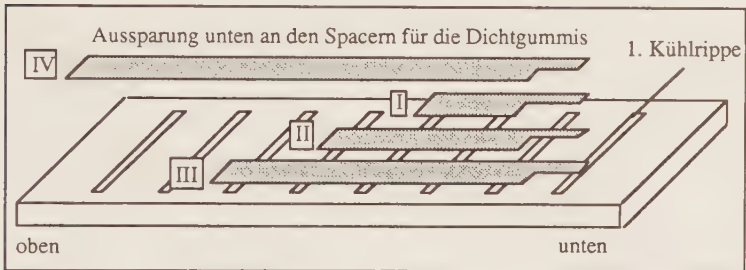
PAA-Sequenz-Gele

Zur Auftrennung der Reaktionsprodukte dienten 8% Polyacrylamid-Gele, die keilförmig mit einer Dicke von 0,1 mm am oberen Ende (Auftragsstelle) und einer Dicke von 0,4 mm am unteren Ende hergestellt wurden (Abb. 3.4.). Dadurch kommt es zu gleichmäßigeren Abständen der einzelnen Banden, wodurch mehr Basen auf einer Spur gelesen werden können. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Apparatur (MacroPhor™) von der Firma LKB eingesetzt, von der auch die Gelapparatur und das Spannungsgerät stammten.

Die obere Platte (mit den Aussparungen für den Kamm) wurde mit Bindsilan (je Platte 18,7 µl gamma-methoxypropyl-trimethoxysilane, 187,5 µl 10% Essigsäure, 6,25 ml Ethanol) vorbehandelt, die untere Thermo-Platte wurde zweifach silikonisiert. Damit wurde gewährleistet, daß das Gel beim Trennen der beiden

Platten an der oberen Glasplatte haften blieb. Die Gellänge betrug 600 mm, die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Leistung von 25 Watt ausgeführt.

Nach Abschluß der Elektrophorese wurde die thermostatisierte Rückenplatte von dem Gel entfernt. Aus dem fest auf der vorderen Platte haftenden Gel wurde der Harnstoff mit 10% Essigsäure herausgewaschen (15 Minuten) und das Gel bei 80 °C vollständig getrocknet. Es schloß sich eine Autoradiographie an; der Film wurde normalerweise nach zwei Tagen entwickelt.



Spacer-Anordnung für ein Keilgel

Abb. 3.4.

3.11.5. Sedimentation in Sucrosegradienten

Die Analyse von markierter Ad2-DNA aus Kernexperimenten erfolgte über alkalische Sucrosegradienten, die einen Konzentrationsbereich von 5% - 20% aufwiesen. Ihr Gesamtvolumen betrug 4,3 ml; das unten gelegene 50% Kissen umfaßte 0,2 ml. Die Zusammensetzung der Gradienten ist der P 3.13. zu entnehmen:

Alkalischer Sucrose-Gradient 5%-20%	
Stammlösung 5%	Stammlösung 20%
5% Sucrose	20 % Sucrose
0,7 mol/l NaCl	0,7 mol/l NaCl
0,3 mol/l NaOH	0,3 mol/l NaOH
5 mmol/l EDTA	5 mmol/l EDTA

P 3.13.

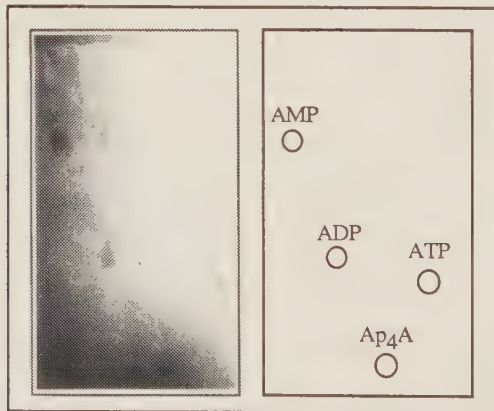
Die Gradienten wurden mittels eines magnetisch gerührten Gradientenmischers gegossen und ruhten jeweils über Nacht, ehe sie eingesetzt wurden. Die Zentrifugation erfolgte in einem Sorvall Ausschwing-Rotor vom Typ AH 650 für zwei Stunden bei 48 000 U/min und 4° C. Danach wurden die Gradienten fraktioniert, wobei typischerweise 25 Fraktionen erhalten wurden.

3.11.6. TCA-Fällung von DNA

Die DNA-Probe wurde mit einem zehnfachen Volumen 5% TCA-Lösung versetzt und 10 min auf Eis gehalten. Danach wurde der entstandene Niederschlag auf GF/C Filtern gesammelt und mit 5% TCA-Lösung nachgespült. Um die Trocknung der Filter zu beschleunigen, wurden sie anschließend noch mit 96% Ethanol durchgesaugt. Nach dem Trocknen konnten die Filter nach Zugabe von 5 ml Quickszint im Szintillationszähler analysiert werden.

3.11.7 Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden

Zur Auftrennung der Nukleotide AMP, ADP, ATP und des Dinukleotids Ap₄A wurden PEI-Cellulose-Dünnschichtfolien der Firma Merck verwendet. Als Laufmittel diente eine Mischung von 0,95 mol/l LiCl und 1 mol/l Essigsäure (7,5:8).



Dünnschicht-chromatografische Trennung von Adenin-Nukleotiden und Ap₄A Abb. 3.5.

Die exakte Einhaltung dieses Mischungsverhältnisses war von entscheidender Bedeutung für die Güte der Trennung. Eine Verschiebung um 10% führte zu nicht mehr unterscheidbarem Laufverhalten von ADP und Ap₄A.

3.12. Bakterienkulturen

3.12.1. Vermehren von Bakterien auf Agarplatten

Bakterien mit einem Resistenzplasmid wurden auf Agarplatten (L-Broth Vollmedium, Zusammensetzung siehe P 3.14.) mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 50 µg/ml) ausplattiert. Die Vermehrung erfolgte bei 37 °C über Nacht. Der Agar mit unten aufgeführter Zusammensetzung wurde nach dem Autoklavieren auf 60 °C im Wasserbad abgekühlt und dann mit einer sterilen Lösung des Antibiotikums auf die angegebene Konzentration gebracht. Danach wurde das Medium in Plastikpetrischalen portioniert und erstarrte dort. Die fertigen Platten wurden bei 4 °C in Plastik verpackt aufbewahrt und maximal vier Wochen gelagert.

3.12.2. Zucht von Bakterien in Flüssigkultur

Um größere Mengen an Bakterien zu gewinnen, wurde eine Übernachtskultur des Stammes in L-Broth Vollmedium (P 3.14.) mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 50 µg/ml) auf 1: 200 in frisches, 37 °C warmes Medium verdünnt, und auf einer Schüttelapparatur bei 37 °C inkubiert. Falls es sich um ein stimulierbares Plasmid handelte, wurde bei einer OD₆₀₀ = 0,8 Chloramphenicol in fester Form (Pulver) zugegeben, bis eine Endkonzentration von 150 µg/ml erreicht war. Danach wurde über Nacht weiter geschüttelt und die Bakterien am nächsten Tag abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 8000 U/min Sorvall GSA oder GS3 Rotor). Dieses Pellet wurde dann für die Plasmidisolation eingesetzt.

L-Broth Vollmedium:	10 g Trypton
	5 g Hefe-Extrakt
	5 g NaCl
auf 1 l H ₂ O, fertiges Medium autoklaviert	

P 3.14.

3.12.3. Erzeugung transformationskompetenter Bakterienzellen

Die kompetenten Zellen wurden nach der Methode von Cohen et al. (1972) hergestellt (mit Ausnahme der DH I Zellen). 1 ml einer Übernachtskultur in L-Broth Vollmedium wurde auf 100 ml frisches Medium bei 37 °C verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,3 - 0,5$ geschüttelt. Die Bakterien wurden durch milde Zentrifugation (5 min, 4 °C, 5000 U/min) gesammelt und anschließend in 50 ml eiskalter, steriler $CaCl_2$ -Lösung suspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation im Eisbad wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und nunmehr in 5 ml der $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen.

E. coli HB 101 Zellen wurden danach entweder sofort verwendet oder mit 14% Glycerin bei -80 °C eingefroren aufbewahrt. Sie behielten ihre Kompetenz für mindestens sechs Monate, normalerweise jedoch erheblich länger. JM 103 Zellen wurden nur frisch verwendet, da sie nach dem Einfrieren rasch die Transformationskompetenz verloren.

3.12.4. Transformation von kompetenten Bakterienzellen

100 µl kompetente Bakterien (nach 3.12.3.) wurden (falls eingefroren bei 0 °C im Eisbad aufgetaut) mit 0,05 bis 1 µg DNA in 10 - 20 µl TE- oder Ligase-Puffer 30 min bei 0 °C im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden sie einem Hitzeschock bei 42 °C für zwei Minuten unterworfen und danach mit 0,4 ml 37 °C warmem L-Broth Vollmedium vermischt. Die Probe wurde noch eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und dann auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert (150 µl / Platte). Falls sehr viele Klone zu erwarten waren, wurde nur ein Volumen von 50 µl je Platte eingesetzt. Die Platten wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.12.5. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Für kürzere Zeiträume von ein paar Wochen wurden die Bakterien auf dick gegossenen Agarplatten (falls erforderlich mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und die Platten, nach der Entwicklung der Klone bei 37 °C, mit Parafilm abgedichtet und in Aluminiumfolie eingepackt. In dieser Form wurden sie bei 4 °C aufbewahrt.

Sollten die Zellen länger erhalten werden, so wurde eine Übernachtskultur (falls erforderlich mit dem entsprechenden Antibiotikum) hergestellt und mit 20% Glycerin vermischt bei -80°C in Aliquots eingefroren. Bei Bedarf wurde davon mit einer Impfnadel ein Inokulum auf einer Agarplatte ausgestrichen und ein Einzelklon davon zum Animpfen einer neuen Übernachtskultur verwendet.

3.12.6. Koloniehybridisierung mit Oligonukleotiden

Um das Auffinden bestimmter Klone, speziell nach Klonierungs- oder Mutageneseversuchen zu beschleunigen, wurde das Verfahren der Koloniehybridisierung (Grunstein und Hognes, 1975, Wallace, 1981) verwendet. Die erhaltenen Klone wurden entweder auf eine Stammpatte in einem regelmäßigen Muster übertragen, oder direkt von der Platte verwendet, auf der die Transformation erfolgte. Auf die Agarplatte wurde ein trockenes, genau passendes Nitrozellulosefilter gelegt; nachdem es sich vollständig benetzt hatte, wurde es wieder abgezogen. Auf ihm hafteten nun die Klone spiegelbildlich zur Platte angeordnet.

Kolonie-Fixierung auf Nitrocellulose-Filtern

Das Filter kam mit den Kolonien nach oben auf ein mit 0,5 mol/l NaOH getränktes Filterpapier und verblieb dort sieben Minuten. Dann folgte ein Transfer auf ein Filter, das mit 1 mol/l Tris/HCl pH 7,5 gesättigt war. Zwei Minuten später kam das Nitrozellulosefilter auf ein neues Filterpapier, das mit 0,5 mol/l Tris/HCl pH 7,5 1,5 mol/l NaCl getränkt war. Nach vier Minuten wurde es auf einem Saugapparat (Grunstein und Hognes) mit 100 ml 0,5 mol/l Tris/HCl pH 7,5 gespült.

Hybridisierungsmix für Oligonukleotide			
1 x NET :	0,15 mol/l NaCl	1 x Denhardt's :	0,02% BSA
	15 mmol/l Tris/HCl pH 8,3		0,02 % Ficoll
	1 mmol/l EDTA		0,02 % PVP-40
Zur Hybridisierung wird verwendet : 6 x NET, 10 X Denhardt's			

Das Filter wurde 30 min bei Raumtemperatur angetrocknet und dann bei 80° C für zwei bis drei Stunden gebacken. Danach konnte es direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden, oder es wurde, in Alufolie verpackt, bei 4° C aufbewahrt.

Zur Hybridisierung wurden die Filter mit der Hybridisierungslösung (siehe P 3.15.) befeuchtet und in einer Petrischale mit dem Hybridisierungsmix bei 54° C eine Stunde hybridisiert.

Nach beendeter Hybridisierung wurde das Filter 3x für fünf Minuten bei 37° C in 6x SSC gewaschen und dann an der Luft 30 min getrocknet. Danach folgte üblicherweise eine Autoradiographie. Statt oder nach dieser wurde das Filter stringent nachgewaschen, 15 min bei 54° C mit 6x SSC, und dann erneut getrocknet und ein neuer Film aufgelegt. Dabei ging der unspezifische Hintergrund um mindestens eine Größenordnung zurück, ohne daß sich die Signale abschwächten.

Der erste Film diente zur exakten Positionierung des Filters für die anschließende Isolierung der positiven Klone.

3.13. Klonieren von DNA in E. coli Zellen

Für die Klonierungen wurden pEMBL, M13 mp8 oder pUC 12 (als Vorläufer von pBstx) als Vektoren verwendet. Kloniert wurde mit dem Verfahren des "directional cloning", bei dem zwei verschiedene Restriktionsenzyme zur Spaltung des Vektors eingesetzt werden. Dieser wurde in den meisten Fällen trotzdem noch nach 3.10.3. dephosphoryliert, um die Vektor-Reinigung soweit als möglich auszuschließen. In einer Gelelektrophorese wurde der nicht essentielle Teil abgetrennt und das Vektorfragment nach einer der in 3.14. beschriebenen Methoden isoliert.

Analog wurde das zu klonierende Fragment aus dem Gel gewonnen und zusammen mit dem Vektorfragment zu einem zirkulären Hybrid mit T4-DNA-Ligase verbunden. Dabei erfolgte bei pEMBL eine Marker-Desaktivierung auf dem Vektor, wodurch der Nachweis rekombinanter Klone wesentlich erleichtert wurde. Sie bestand in einer Inaktivierung des alpha-Peptids, wodurch das rekombinante Plasmid die Fähigkeit zur lac-alpha-Komplementation einbüßte. Das Verhältnis der eingesetzten DNA-Konzentrationen betrug im Allgemeinen 1:2 bis 1:5 (Vektor zu Insert, molare Verhältnisse).

3.14. DNA-Isolierungen

3.14.1. Plasmidisolierung durch Dichtegradienten-Zentrifugation

300 ml L-Broth Vollmedium (mit Antibiotikum, P 3.16.) wurden mit 3 ml einer Übernachtskultur des plasmidhaltigen Bakterien-Stammes angeimpft und auf einem Schüttler bei 37 °C (150 U/min) inkubiert. Falls es sich um ein stimulierbares Plasmid handelte, wurde bei einer $OD_{600} = 0,8$ festes Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 150 µg/ml zugegeben. Danach verblieb die Kultur über Nacht in dem Schüttler.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 8000 U/min, Sorvall GSA) geerntet und das Medium abgegossen. Das Pellet wurde in 3,2 ml eiskaltem Sucrosepuffer P (P 3.16.) resuspendiert, in einen 40 ml Zentrifugenbecher (Sorvall SS34) überführt, und mit 3 g festem Lysozym versetzt. Die Suspension wurde 10 min bei 4 °C inkubiert, dann wurden 4 ml Triton-Lysis-Mix (P 3.16.) zugegeben und weitere 10 min bei 4 °C inkubiert.

Es schloß sich eine Zentrifugation bei 4 °C an (Sorvall SS34, 30 min, 20 000 U/min). Der plasmidhaltige Überstand (cleared lysate) wurde von dem Pellet (soft-pellet) abdekantiert. Dazu kamen 3,325 g CsCl, sowie 175 µl Ethidium-bromidlösung (10 mg/ml) und in der Ultrazentrifuge wurde die Lösung in einem TV 865 Vertikalrotor bei 15 °C für 18 Stunden mit 47 000 U/min zentrifugiert.

Unter UV-Licht (366 nm) konnte die Bande ca. in der Mitte des Röhrchens gesehen und mittels einer Einwegspritze durch seitliches Anstechen des Röhrchens abgezogen werden. Das Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Extraktion mit CsCl-gesättigtem Isopropanol (je 1 Volumen) entfernt und die DNA-Lösung 3 x gegen TE-Puffer dialysiert. Anschließend ließ sich die DNA-Konzentration photometrisch bestimmen (260 nm). Die Reinheit der Präparation wurde durch Gelelektrophorese in einem Agarosegel überprüft.

Sucrose-Puffer P :	Triton-Lysis-Mix:
15% Sucrose	50 mmol/l Tris/HCl pH 8,0
50 mmol/l Tris/HCl pH 8,0	60 mmol/l EDTA
50 mmol/l EDTA	0,2% Triton X-100

P 3.16.

3.14.2. Plasmid Schnellpräparation

Zur schnellen Gewinnung kleiner Plasmid-Mengen wurde eine 5 ml Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes gezüchtet. Die Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur (3000 U/min) in einer Tischzentrifuge geerntet. Das Pellet wurde in 100 µl Sucrose-Puffer P (P 3.16.) aufgenommen und mit 10 µl einer frisch bereiteten Lysozym-Lösung gemischt (20 mg/ml, in Sucrose-Puffer P).

Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dannach wurden 200 µl einer ebenfalls frisch hergestellten NaOH Lösung zugegeben (0,2 mol/l NaOH, 1% SDS). Die Lösungen wurden durchmischt und verblieben 5 min auf Eis. Dann wurde mit 150 µl eiskalter Kaliumacetalösung (5 mol/l, pH 4,8) neutralisiert, auf dem Vortex gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert.

Das Lysat ließ sich durch 5 minütiges Zentrifugieren in einer Eppendorf-zentrifuge von den unlöslichen Bestandteilen befreien und dann in ein neues Gefäß überführen. Dort wurde einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und dann mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde nach 5 min abzentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Es konnte dann mit Restriktionsenzymen geschnitten werden.

3.14.3. Phagenzucht und plaque-Test von F1 und M13-Phagen

Zur Vermehrung der filamentösen Phagen F1 und M13 (Übersicht bei Zinder et al., 1982, BRL INC., 1980) wurde eine Übernachtskultur von JM 103 Zellen in YT-Medium (P 3.17.) auf 1:50 in YT-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer $OD_{680} = 0,1$ geschüttelt (BRL, 1980). Dann wurde mit einem Einzelplaque-Äquivalent des jeweiligen Phagen infiziert und weitere vier bis fünf Stunden geschüttelt. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert (10 min, 7000 U/min, 4 °C) und der Überstand für 10 min auf 65 °C gebracht. Er enthielt normalerweise Phagenkonzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{11}$ und $5 \cdot 10^{12}$ pfu/ml.

Phagenstock

Alternativ zu der Phagenzucht in Flüssigkultur wurden auch Phagenstocks aus Agarplatten hergestellt. Dazu wurde eine mit einem dichten Bakterienrasen von JM 103 Zellen bewaschene YT-Agarplatte mit einem Weichagar (P 3.18.) über-

schichtet, der 1% eines Einzelplaque-Äquivalents enthielt. Die Platte wurde dann für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 5 ml YT-Medium (P 3.17.) überschichtet.

YT-Medium :	Minimalagar:
8 g/l Bacto-Tryptone	15 g/l Bactoagar
5 g/l Hefe-Extrakt	0,5 g/l K_2HPO_4
5 g/l NaCl	4,5 g/l KH_2PO_4
	1 g/l $(NH)_2SO_4$
	0,2 g/l Mg_2SO_4
	5 µg/l Thiamin/HCl
	2 g/l Glukose
	0,5 g/l Natriumcitrat x $2H_2O$

P 3.17.

Entweder wurde die Inkubation bei 37 °C für weitere 4-5 Stunden fortgesetzt, oder die Platte über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Um eventuell darin befindliche Bakterien zu entfernen, wurde der Überstand bei 7000 U/min für 10 min zentrifugiert und 30 min bei 65 °C inkubiert. Die so gewonnene Phagenstocklösung enthielt zwischen $1 \cdot 10^{12}$ und $5 \cdot 10^{12}$ pfu/ml und war bei 4 °C unter Lichtabschluß mindestens ein Jahr stabil.

Plaque-Test mit F1 und M13 Phagen

Es wurde eine Übernachtskultur von JM 103 Zellen in YT-Medium (P 3.17) auf 1:10 in YT-Medium verdünnt und bei 37 °C 2-3 Stunden geschüttelt (Vorkultur).

Auf YT-Agarplatten wurden dann Phagenverdünnungen von 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8} und 10^{-10} in einer Weichagar-Überschichtung (P 3.18.) auf die Platten aufgebracht und nach dem Erstarren des Agars über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag konnten die gebildeten Plaques auf den Platten zur Titerbestimmung ausgezählt werden.

Weichagar-Überschichtung für Plaque-Test	
Weichagar:	6g Agarose auf 1 l Wasser
je Platte :	0,3 ml Phagenverdünnung 0,2 ml JM 103 Vorkultur 3 ml Weichagar
nur bei M13:	10 µl 100 mmol/l IPTG 50 µl 2% X-Gal

P 3.18.

3.14.4. pEMBL-Einzelstrang Isolierung

Die Isolierung folgt im Wesentlichen der bei Dente et al. (1983) beschriebenen Methode. Ein Inokulum einer Glycerinkultur des plasmidhaltigen Stammes wurde zweimal über Ampicillin-Minimalagarplatten (P 3.17.) überimpft. Eine davon bereitete Übernachtskultur in YT-Medium (P 3.17.) wurde am nächsten Tag 1:50 in YT-Medium (P 3.17.) verdünnt.

Bei einer $OD_{680} = 0,3$ wurde die Bakteriensuspension mit 1/1000 Volumen einer F1-Phagen Lösung (10^{11} pfu/ml) infiziert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 15 000 U/min abzentrifugiert (Sorvall SS 34, 10 min, 4 °C) und der Überstand zur Entfernung restlicher Zellen rezentrifugiert. Er wurde dann bei 65 °C 15 min inkubiert und die Phagenlösung entweder bei 4°C aufbewahrt oder sofort zur Einzelstrang-Isolation eingesetzt.

Die Phagensuspension wurde mit 1/4 Volumen PEG-Lösung (P 3.19.) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur belassen. Dannach wurde das Pellet bei 15000 U/min 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die restliche Flüssigkeit wurde von dem Pellet entfernt, dann 1/10 Volumen TES (P 3.19.) zugegeben und resuspendiert. Die Lösung wurde mit 1/20 Volumen Phenol/TE extrahiert und die wässrige Phase abgenommen. Die Extraktion wurde nochmals wiederholt und die DNA-haltigen Phasen vereint.

Es schloß sich eine Ethanolfällung nach 3.10.1. an, die eine Stunde bei -80 °C belassen wurde. Das Pellet wurde dann 20 min bei 15 000 U/min abzentrifugiert und

kurz in einer Speed-Vac-Apparatur getrocknet (10 min). In dieser Form wurde es bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

PEG-Lösung:	20% PEG	TES:	20 mmol/l Tris/HCl pH 7,5
	2,5 mol/l NaCl		10 mmol/l NaCl
			0,1 mmol/l EDTA

P 3.19.

3.14.5. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen durch direkte Elution

Nach dem Auftrennen der Fragmente in einem Agarosegel (mit Ethidiumbromid), wurde das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment unter UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in eine mit Glaswatte gestopfte Pipettenspitze überführt. Die weitere Behandlung erfolgte analog dem in 3.11.2 beschriebenen Verfahren für Oligonukleotide. Zur Elution wurde aber nicht Wasser, sondern ein Puffer (1% SDS, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris HCl pH 8,0) eingesetzt. Die so gewonnene DNA (Ausbeute 50-70%) wurde noch einer Ethanolfällung unterzogen und konnte anschließend in Klonierungsexperimente eingesetzt werden.

3.14.6. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen über Membranfilter

Als das effizienteste Verfahren zur Isolierung kleiner und mittlerer DNA-Fragmente erwies sich die von Weinberg und Hammerskjöld (1980) beschriebene Methode. Dabei wurde ebenfalls das Fragment, nach der Auftrennung durch Elektrophorese, im UV-Licht (366 nm, erforderlichenfalls 254 nm) lokalisiert.

Unmittelbar vor dem Fragment (in Laufrichtung) wurde ein Einschnitt in das Gel gemacht, ein zweiter dahinter. In beide Spalten kam ein vorbereiteter Filterstreifen, so daß die Bande dazwischen lag. Dann wurde die Elektrophorese fortgesetzt, wobei das Fragment auf den vorderen Filter aufwanderte. Der hinter dem Fragment befindliche Filterstreifen verhinderte das Einwandern größerer Fragmente.

Die Membran wurde anschließend aus dem Gel gezogen (sie hatte einen rötlichen Schimmer durch das mit der DNA aufgebrachte Ethidiumbromid) und mit NET-Puffer (Tabelle 3.8.) gewaschen. Anschließend wurde sie in ein Eppendorfgefäß mit

soviel Hochsalm- NET -Puffer (P 3.19.) überföhrt, daß die Membran gerade davon bedeckt wurde (ca. 100 - 300 μl) und eine Stunde bei 65 °C eluiert.

Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde anschließend 3 x mit je einem Volumen n -Butanol (NET -gesättigt) extrahiert und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Um die Salzkonzentration zu erniedrigen wurde das Pellet danach in 100 μl 0,3 mol/l Natriumacetat aufgenommen und erneut mit Ethanol ausgefällt. Die so gereinigte DNA ließ sich anschließend problemlos spalten oder ligieren und konnte in 60 bis 90% Ausbeute erhalten werden.

NET-Puffer:	150 mmol/l NaCl	Membran-Filter + Manual
	0,1 mmol/l EDTA	
	20 mmol/l Tris/HCl pH 8,0	Schleicher&Schüll
Hochsalm- NET -Puffer:	1,0 mol/l NaCl	S&S Na-45 DEAE Membran
	0,1 mmol/l EDTA	
	20 mmol/l Tris/HCl pH 8,0	

Lösungen für die Fragmentisolierung mit DEAE-Membranen

Tabelle 3.8.

3.14.7. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen durch Elektro-Elution

Das Agarose-Stück, in dem das erwünschte DNA-Fragment enthalten war, wurde nach der Auftrennung in der Elektrophorese unter UV-Licht identifiziert und ausgeschnitten. Es wurde zusammen mit einem Volumen Elektrophoresepuffer in einem vorbehandelten Dialyseschlauch (Tabelle 3.9.) eingeschlossen und in ein Fenster im Gel gelegt. Dann wurde die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis sich keine Ethidiumbromid-Färbung des Agarosestückes im Dialyseschlauch mehr erkennen ließ. Jetzt wurde die Apparatur für eine Minute umgepolt, um die DNA von der Schlauchwandung zu lösen.

Der DNA-haltige Puffer wurde abpipettiert und über silanisierte Glaswatte filtriert, um eventuelle Agarose-Stückchen zu entfernen. Dann wurde die DNA nach 3.10.1. mit Ethanol präzipitiert und konnte für weitere Versuche eingesetzt werden. Die Ausbeute bei dieser Methode betrug zwischen 50 und 80 Prozent.

Vorbehandlung des Dialyseschlauches für die Elektroelution

15 min in 0,1 mol/l NaHCO_3 autoklavieren
 15 min in 1 mmol/l EDTA autoklavieren
 1 Stunde in H_2O rühren
 15 min in H_2O nachspülen

Tabelle 3.9.

Das Verfahren von Langridge et al. (1980) wurde ebenfalls erprobt. Es basiert auf der Verwendung von niedrig schmelzender Agarose (Sigma Typ VII, A-4018), aus der die DNA in flüssiger Phase extrahiert wird. Da dieses Verfahren sowohl wesentlich geringere Ausbeuten lieferte, verglichen mit den unter 3.14.5. bis 3.14.7. beschriebenen Methoden, als auch nicht dieselbe Reinheit der DNA erreichte, wurde es für die Versuche nicht eingesetzt.

3.15. Oligonukleotid-abhängige DNA-Mutagenese

Für die Mutagenese wurde ein Verfahren mit einem synthetischen Oligonukleotid eingesetzt, wie es von Zoller und Smith (1982) beschrieben wurde. Als Einzelstrangvektor wurde nicht der M13 Phage verwendet, sondern das Plasmid pEMBL (Dente et al., 1983), das sich ebenfalls in einzelsträngiger Form isolieren läßt.

Zunächst wurde der Einzelstrang des zu mutierenden Plasmids nach 3.14.3 isoliert, das Oligonukleotid nach 3.11.2 gereinigt und wie unter 3.10.5. beschrieben 5'-phosphoryliert. Um das Oligonukleotid an die DNA zu binden, wurden 1 pmol lyophilisierte Einzelstrang-DNA, 20 pmol 5'-phosphoryliertes Oligonukleotid sowie 1 µl Lösung A (Tabelle 3.10.) in 10 µl Gesamtvolumen gemischt und 5 min bei 55 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz langsam im Wasserbad auf 23 °C abgekühlt (ca. 30 min).

Jetzt wurden 10 µl Lösung B (Tabelle 3.10.) zugefügt, sowie 2 u Klenow-Fragment der DNA-Polymerase und 5 u T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde für 20 Stunden bei 16 °C inkubiert und anschließend direkt auf kompetente E. coli HB101 Zellen (nach 3.12.3. bereitet) transformiert (3.12.4.).

Lösung A:	Lösung B:
0,2 mol/l Tris/HCl pH 7,5	20 mmol/l Tris/HCl pH 7,5
0,1 mol/l MgCl ₂	10 mmol/l MgCl ₂
10 mmol/l DTT	10 mmol/l DTT
0,5 mol/l NaCl	1 mmol/l ATP
	1 mmol/l dTTP
	1 mmol/l dGTP
	1 mmol/l dCTP
	1 mmol/l dATP

Lösungen für die Mutagenese nach
Zoller and Smith (1982)

Tabelle 3.10.

Auf die beschriebene Zugabe radioaktiv markierten dCTP's wurde nach anfänglichen Versuchen verzichtet. Zur Identifizierung der Mutanten wurden die entstandenen Klone auf Nitrozellulosefilter kopiert und diese mit dem eingesetzten Oligonukleotid einer Kolonie-Hybridisierung nach 3.12.6 unterzogen. Positive Klone wurden noch zusätzlich durch Schnellaufschlüsse nach 3.14.2. charakterisiert und dann das mutierte Plasmid nach 3.14.1 isoliert.

3.16. Computeranalysen

Die Sequenzanalysen der Plasmide wurden mit den Sequenzprogrammen von Larson and Messing (1982) auf einem Apple II Euro plus durchgeführt. Die Programmsammlung war zu diesem Zweck durch einige eigene Programme erweitert worden (z.B. Identifikation von Fragmentmustern aus partiellen Restriktionsverdauungen). Als Grundlage dienten dabei die mit diesen Programmen mitgelieferten Sequenzdaten, sowie nach der Literatur und den erfolgten Klonierungen selbst erstellte Sequenz-Files.

Die Analysen mit der Ad2-Gesamtsequenz wurden anhand einer Sequenzdokumentation des Genzentrums der Universität München in Martinsried (Computer vom Typ Vax) ausgeführt. Diese Untersuchungen wurden durch weitere Studien mit den Sequenzprogrammen der Firma Beckmann (Microgenie, Queen and Korn, 1984) auf einem IBM XT Personal-Computer ergänzt. Dieses Gerät wurde vor allem bei der Auswertung der Sequenzierungsdaten eingesetzt.

4. Ergebnisse

Untersuchungen über die Rolle von Ap₄A in der Ad2 DNA-Replikation

4.1. Einfluß von Ap₄A auf die [³H]-dTTP Inkorporation

Das Dinukleotid Ap₄A kann den Einbau von [³H]-dTTP in Ad2-DNA unter verschiedenen Bedingungen stimulieren (Reiter, 1980b, Werner, 1981). Da dieser Effekt von Versuch zu Versuch eine große Streubreite aufwies, wurde abgeklärt, in wie weit sich diese Variation durch Parameter des Zellwachstums beeinflussen ließ. Dazu wurden die HeLa-Zellen vor Beginn der Versuche in unterschiedlicher Weise vorbehandelt. Die Infektion mit Adenovirus Typ 2 erfolgte jeweils nach der Vorbehandlung der Zellen.

Allgemeine Bedingungen

Die Kernisolation, sowie der in vitro Replikationsassay liefen immer nach den in 3.4. und 3.7. beschriebenen Methoden ab. Die Kinetik wurde jeweils 30 min verfolgt und über einen alkalischen Sucrose-Gradienten (3.11.5.) analysiert.

4.1.1. Replikationskinetik mit HeLa-Zellen, die mit reduziertem Serum gezüchtet wurden

HeLa-Zellen wurden unter 3 verschiedenen Serumkonzentrationen gezüchtet. Dabei diente die normale Kultur, mit 10% Serum neugeborener Kälber, als Standard, auf den die Versuche bezogen wurden (Kontrolle in Abb. 4.5).

Daneben wurden die Zellen mit 5% Serum gezüchtet. Die erste Passage zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle, in der zweiten Passage verlangsamte sich das Wachstum um ca. 2/3 gegenüber dem Standard. Es blieb auch bei weiteren Passagen konstant und normalisierte sich nach Erhöhung der Serumkonzentration wieder.

Zellen, die mit nur 2% Serum kultiviert wurden, zeigten bereits in der ersten Passage ein drastisch verringertes Wachstum, in der zweiten Passage stagnierte die Zellteilung vollständig. Weitere Passagen waren nicht möglich, die Zellen starben ab. Für die Versuche wurden daher die reversibel inhibierten Zellen der 5% Serum-Kulturen eingesetzt.

Wie in Abb. 4.1. zu sehen ist, konnten mit Kernen aus so vorbehandelten Zellen lineare Kinetiken für den Einbau von [^3H]-dTTP erhalten werden. Die alkalischen Sucrose-Gradienten zeigten, daß das radioaktive Material mit Ad2-DNA kosedimentierte. Ap_4A bewirkte eine anfängliche Stimulierung, die ca. 20 min andauerte.

Kernkinetik mit Kernen aus Zellen, die mit 5% Serum kultiviert wurden

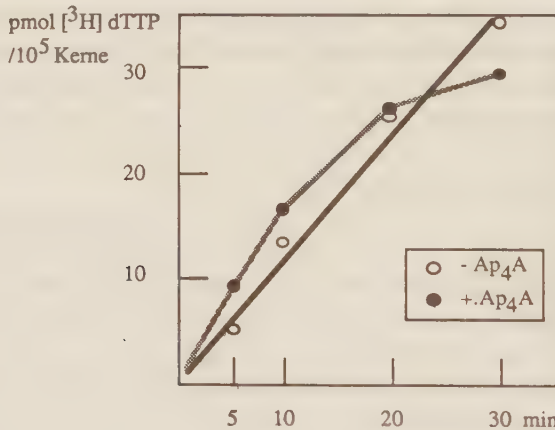


Abb. 4.1.

4.1.2. Reaktionskinetik unter dem Einfluß von Proteinbiosynthese-Inhibitoren

Um den Einfluß von Proteinbiosynthese-Inhibitoren auf die Kernkinetiken zu untersuchen, wurde zunächst Cycloheximid eingesetzt. Vier Stunden vor Beginn der Kernisolation (nach 3.4.) wurde das Medium auf eine Endkonzentration von 100

$\mu\text{mol/l}$ Cycloheximid gebracht. Die damit erzielten Resultate sind in Abb. 4.2. dargestellt. Es ergaben sich reproduzierbar nicht lineare Kinetiken, deren Gesamteinbau auf ca. 30% gegenüber den Versuchen mit 5% Serum zurückfiel. Die Kontrollen in den Sucrose-Gradienten zeigten, daß kein spezifischer Einbau von ^3H -Aktivität in Ad2-DNA erfolgt war. Offensichtlich waren die Zellkerne nach vierstündiger Einwirkung von Cycloheximid nicht mehr in der Lage, Ad2-DNA zu replizieren. Eine Wiederholung der Versuche mit Cycloheximid, bei denen der Inhibitor erst zwei Stunden vor der Kernisolation zugegeben wurde, ergab eine gut lineare Kinetik (Abb. 4.3.), die auch insgesamt wieder höhere Einbauraten an $[\text{}^3\text{H}]$ -dTTP aufwies.

Daher wurden bei weiteren Versuchen die Inhibitoren der Proteinbiosynthese nur noch zwei Stunden vor Beginn der Kernisolation zugesetzt.

Kernkinetik mit Cycloheximid-vorbehandelten Zellen (vier Stunden)

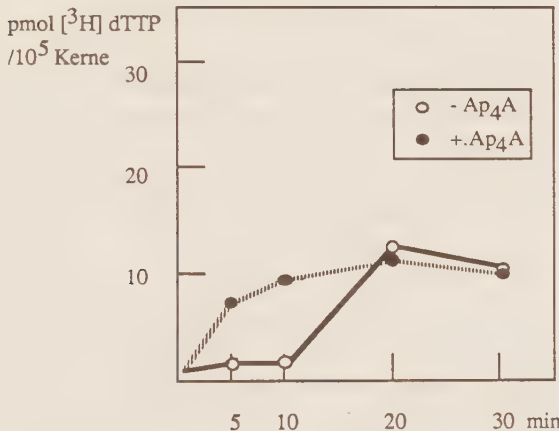


Abb. 4.2.

Kernkinetik mit Cycloheximid-vorbehandelten Zellen (zwei Stunden)

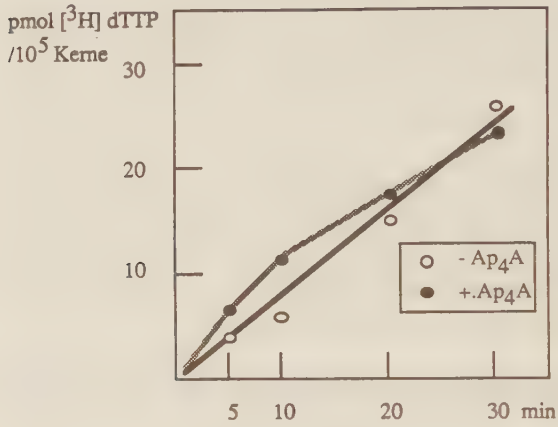


Abb. 4.3.

Alkalische Sucrose-Gradienten von Kernkinetiken

+ Cycloheximid (2 h)

Kontrolle

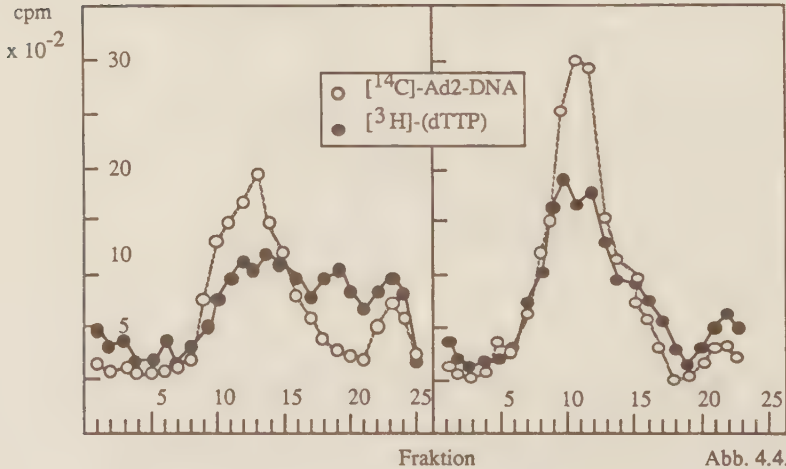


Abb. 4.4.

Die Sucrosegradienten zeigten allerdings, daß sich nach der Cycloheximid-Behandlung ein Teil des [^3H]-markierten Materials in kleineren Aggregaten als Ad2-Gesamt-DNA wiederfand. In Abb. 4.4. ist exemplarisch ein Vergleich zweier Gradienten zu sehen (Kontrollgradient und Gradient unter Einfluß des Inhibitors).

Versuche mit Anisomycin

Alternativ zu Cycloheximid wurde der Proteinbiosynthese-Inhibitor Anisomycin eingesetzt. Er kam gleichfalls zwei Stunden vor Beginn der Kernisolation in das Medium der Zellen (Endkonzentration 100 $\mu\text{mol/l}$). Die Kinetiken verliefen denen mit Cycloheximid annähernd parallel, in den Gradienten zeigte sich aber ein etwas besser ausgebildeter Gipfel, der Ad2-DNA entsprach.

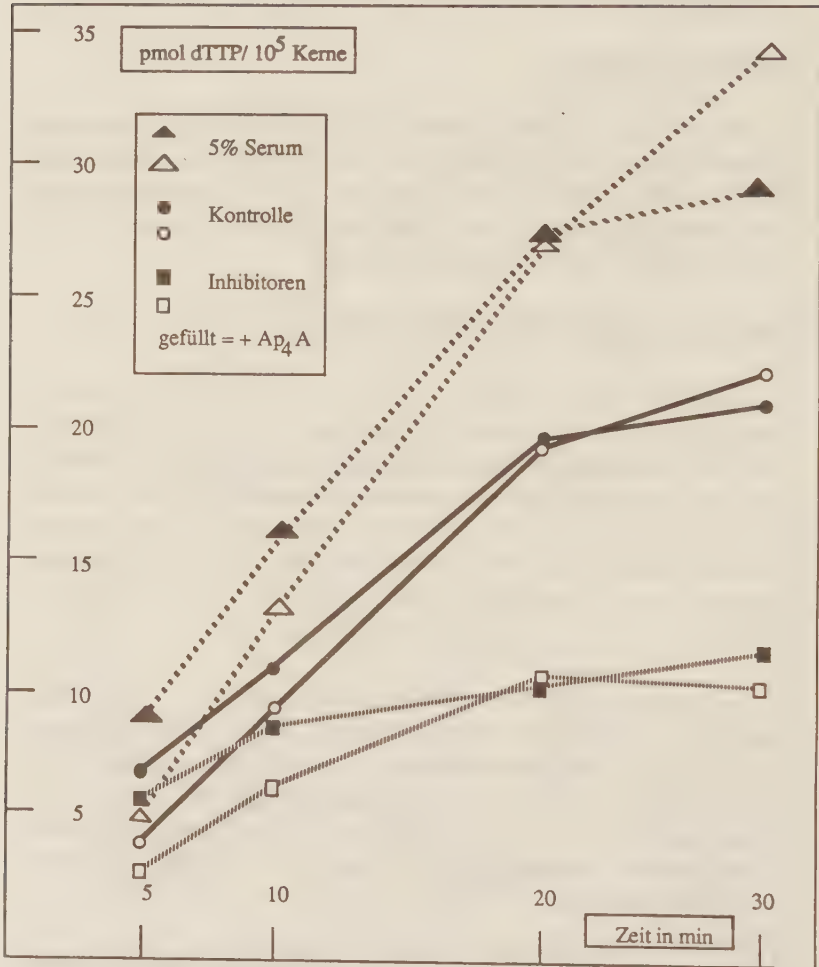
4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.1.1. und 4.1.2.

Die Gesamtsynthese war bei den unter Serumangel kultivierten Zellen am höchsten, im Falle der Proteinbiosynthese-Inhibitoren am niedrigsten (Abb. 4.5.). Zwischen beiden Werten lagen die Kinetiken der Kontrollversuche. Es kam in einzelnen Versuchen zu länger andauernder Stimulation des [^3H]-dTTP Einbaus durch Ap_4A , wobei sich dieser Effekt nur in den Kontrollen und den serumgehungerten Zellkernen fand. Diese Stimulierung, die den Faktor vier erreichte, erwies sich jedoch als nicht reproduzierbar, weshalb sie nicht in die Grafik aufgenommen wurde.

Der anfängliche Stimulationseffekt, den Ap_4A in allen drei Versuchsserien zeigte, ließ sich gut reproduzieren, hielt aber stets nur etwa 20 min an. Die Stärke der Stimulierung variierte dabei kaum unter den verschiedenen Bedingungen der Experimente und betrug anfangs ca. 1,5 bis 2-fache Synthese. Die Konstanz dieses Effektes beweist, daß es sich um kein Artefakt handelt. Allein aus dem Verlauf der Kinetiken und den Sucrosegradienten lassen sich aber keine konkreten Rückschlüsse auf die Ursachen ziehen.

In der Abb. 4.5. sind die Ergebnisse aus den verschiedenen Versuchen in einer Übersicht zusammengefaßt:

Der Ap_4A -Effekt auf vorbehandelte Ad2-infizierte HeLa-Zellkerne



Für die Kontrolle wurden HeLa-Zellen eingesetzt,
die mit 10 % Serum kultiviert worden waren.

Abb. 4.5.

4.2. Inkorporation und Degradation von Ap₄A

4.2.1. Analytisches System zum Nachweis von Ap₄A in den Extrakten

Das Dinukleotid Ap₄A ließ sich dünnschicht-chromatographisch neben den Nukleotiden AMP, ADP und ATP nachweisen. Dazu dienten PEI-Cellulose DC-Folien, die in eine Glaskammer mit dem in 3.11.7. beschriebenen Laufmittel gestellt wurden.

Wie in Abb. 3.5. zu sehen ist, erfolgt unter diesen Bedingungen eine klare Trennung der verschiedenen Nukleotide, so daß der Nachweis des Ap₄A auch in Kernextrakten möglich war. Durch die Verwendung von ³H-markiertem Ap₄A konnten auch kleinste Mengen der Substanz oder ihrer Abbauprodukte gefunden werden.

Der Test auf Ap₄Ase-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 100 µl der zu untersuchenden Fraktion wurden zusammen mit 100 µl 1 mmol/l [³H]-Ap₄A eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 30 µl dieser Ansätze dünnschicht-chromatographisch getrennt und die Platten mit Hilfe eines Scanners mit offener Zählkammer (erforderlich zur ³H-Messung) analysiert.

Das Cytoplasma wurde jeweils so eingesetzt, wie es bei der Kernisolation nach 3.4. erhalten wurde, die Kerne wurden 50 min lang mit 150 mmol/l NaCl extrahiert und abzentrifugiert. Der Salzextrakt wurde dann als Kernfraktion verwendet. Zur Kontrolle dienten dabei Parallelversuche, bei denen der Replikationsmix in normaler Konzentration zugesetzt wurde. Dieser Mix wurde auch jeweils in einer eigenen Spur der Platte mitgeföhren, um die Position der einzelnen Nukleotide zu markieren.

Die normale Ap₄Ase-Aktivität, die durch die reversible Reaktion der Lysyl-tRNA-Synthetase gegeben ist, konnte in diesem einfachen System nicht nachgewiesen werden. Sie hätte auch zu einer Spaltung durch die Extrakte nichtinfizierter HeLa-Zellen führen müssen. Die Versuche zeigen eindeutig, daß sich Ad2-infizierte HeLa-Kerne in ihrer Ap₄Ase-Aktivität von nicht infizierten Kernen unterscheiden (Abb. 4.6.).

Ap₄Ase-Aktivität zellulärer Fraktionen

Fraktion	Ap ₄ Ase-Aktivität	Abbauprodukte nachgewiesen
nicht infiziertes Cytoplasma	negativ	Keine
infiziertes Cytoplasma	negativ	Keine
nicht infizierte Zell-Kerne	negativ	Keine
infizierte Zellkerne	positiv	AMP,ADP, (ATP)

Abb. 4.6.

Dieser Effekt ließ sich durch die Zugabe des Replikationsmixes, der ATP enthielt, reduzieren. Die Aktivitäten, die AMP und ADP entsprechen, verschwinden aber nicht vollständig. Ein mit ATP korrespondierender Gipfel liegt unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb nicht eindeutig feststellbar ist, ob es zu den erzeugten Abbauprodukten zählt. Es ist allerding sehr wahrscheinlich, daß es in diesem Fall rasch zu ADP abgebaut würde.

Es sei darauf hingewiesen, daß es sich bei den dünn-schichtchromatographisch identifizierten Nukleotiden nur um solche handelt, die ³H-Aktivität aus Ap₄A enthalten, eine Störung durch zelluläre Nukleotidspiegel oder den zugesetzten Mix ist somit ausgeschlossen. Für die Ad2-infizierten HeLa-Zellkerne zeigt Abb. 4.7. die Kurven des Scanners für Versuche mit und ohne den Replikationsmix. Die Positionen der einzelnen Nukleotide sind markiert.

Nachweis von ^3H -Aktivität in Ap_4A -Abbauprodukten

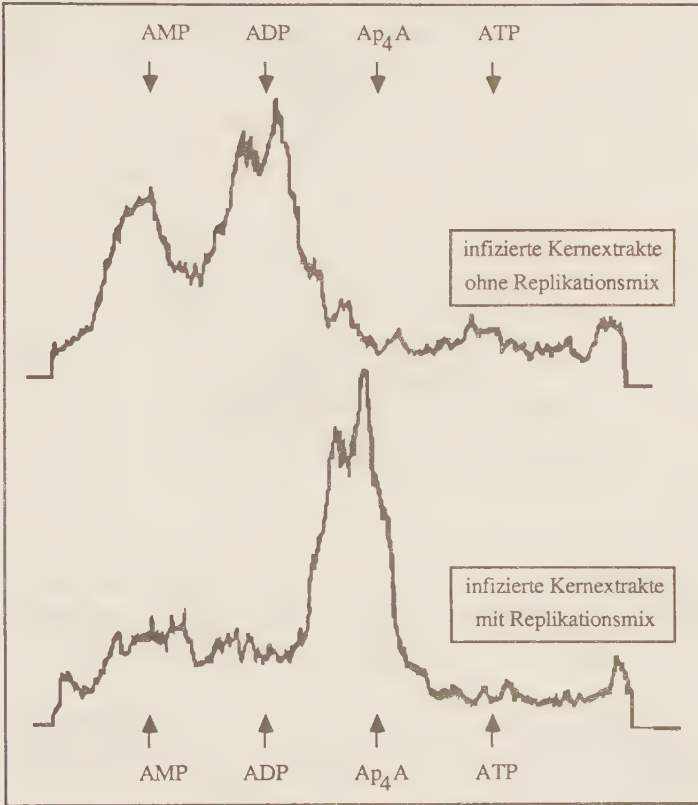


Abb. 4.7.

4.2.2. Inkorporation von ^3H -Aktivität aus Ap_4A in Ad2-DNA

Versuche, bei denen nur Ap_4A mit Tritium markiert war, erbrachten eine flache Kinetik (säurefällbares Material, nur unmarkierte Nukleotide). Dabei wurde das Ap_4A in der üblichen Konzentration ($100\ \mu\text{mol/l}$) eingesetzt, wobei die spezifische Aktivität $1\ \text{Ci/mmol}$ betrug. Die Reaktionsprodukte wurden im alkalischen Sucrose-Gradienten analysiert:

Inkorporation von ^3H -Aktivität aus Ap_4A (1 Ci/mmol)
in Ad2-analog sedimentierendes Material

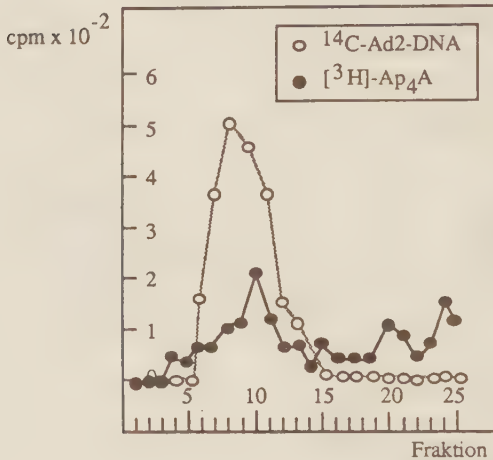


Abb. 4.8.

Wie Abb. 4.8. zeigt, erfolgte ein signifikanter Einbau von Radioaktivität in alkalistabiles und säurefällbares Material, das mit Ad2-DNA kosedimentierte. Demnach wurde die Adenin-Base (^3H -markiert) aus Ap_4A in Ad2-DNA inkorporiert.

Falls dies kein Artefakt unspezifischer Natur ist, sollte es möglich sein, das Signal durch den Einsatz größerer spezifischer Aktivitäten an $[^3\text{H}]$ - Ap_4A gegenüber dem Hintergrund anzureichern. Außerdem dürfte in Abwesenheit von Ad2-DNA keine Aktivität unter dem Marker zu finden sein.

Ein entsprechendes Experiment wurde durchgeführt, das Ergebnis zeigt Abb. 4.9.: Der Gipfel unter dem Virus-DNA-Marker konnte durch die verzehnfachte spezifische Aktivität des eingesetzten Ap_4A um den Faktor fünf gesteigert werden, ohne daß der Hintergrund sich verstärkte. Damit ist eine wesentliche Bedingung für den spezifischen Einbau in Ad2-DNA erfüllt.

Inkorporation von ^3H -Aktivität aus Ap_4A (10 Ci/mmol)
in Ad2-analog sedimentierendes Material

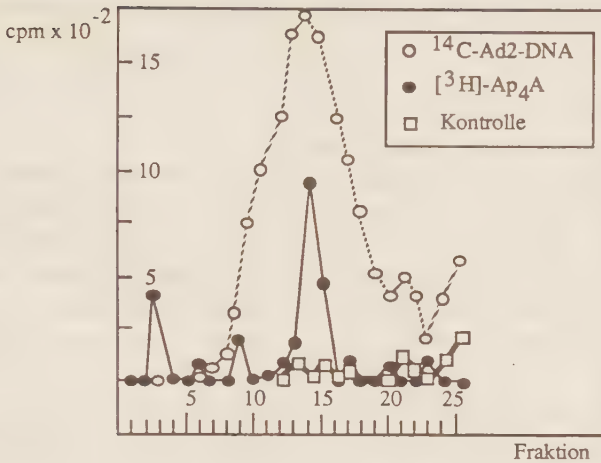


Abb. 4.9.

Mit den rechteckigen Symbolen ist das Ergebnis eines Kontrollversuches eingetragen, der die Ad2-Spezifität des Einbaues abklären sollte. Dabei wurde ein identischer Ansatz mit der gleichen spezifischen Aktivität von 10 Ci/mmol [^3H]- Ap_4A mit nicht infizierten HeLa-Zellkernen durchgeführt.

In diesem Fall fehlt nicht nur der Gipfel unter Ad2-DNA, sondern es wird überhaupt kein alkalistabiles Material mit höherer Schwebedichte gebildet. Der Ap_4A -Einbau tritt also erst nach der Adenovirus-Infektion auf, und dürfte damit virusspezifisch sein.

4.2.3. Vergleich infizierter und nichtinfizierter HeLa-Zellkerne

Um auszuschließen, daß Ap_4A in den nichtinfizierten Zellkernen nur deshalb nicht in säurefällbares Material eingebaut wurde, weil unter diesen Bedingungen keine zelluläre DNA-Synthese stattfand, wurden Versuche unter den in 3.7. geschilderten Standardbedingungen durchgeführt, bei denen nicht infizierte Kerne

eingesetzt wurden. Erwartungsgemäß fand sich in den Gradienten markiertes Material mit sehr hohem Sedimentationskoeffizienten, das aus zellulärer Reparatursynthese stammt. Ohne die Ad2-Infektion wird sie nicht unterdrückt. Dieser Einbau von [^3H]-dTTP ließ sich unter dem Einfluß von Ap_4A um den Faktor vier steigern (ohne Abb.).

Proteinbindung von Ap_4A

Ein Western-Blot von Kernextrakten aus infizierten und nichtinfizierten Kernen zeigte jeweils eine große Vielfalt von Proteinen, die Ap_4A aus der Lösung binden konnten. Es ließ sich durch Behandeln mit einem Kochsalzgradienten leicht wieder abwaschen (10 mmol/l bis 200 mmol/l), ohne daß sich dabei präferentiell bindende Banden gezeigt hätten. Auch waren keine Unterschiede zwischen den infizierten und den nicht infizierten Kernen feststellbar, so daß dieser Weg nicht weiterverfolgt wurde.

Der Unterschied in der Ap_4Ase Aktivität zwischen den infizierten und den nicht infizierten Kernen konnte aus den oben angesprochenen Gründen keiner bestimmten Proteinkomponente zugeordnet werden. Da Ap_4A eine regulatorische Rolle zugeschrieben wird (Varshavsky, 1983, Bochner et al., 1984), war auch nicht zu erwarten, daß sich neue Proteine an seinem Abbau beteiligten, sondern daß es sich dabei um normalerweise ohnehin vorhandene Enzyme handelte.

4.2.4. Beeinflussung der Reaktionskinetik durch snake-venom-phosphodiesterase

Die Phosphodiesterase aus dem Gift der Klapperschlange, snake-venom-phosphodiesterase, hydrolysiert Ap_4A präferentiell vor anderen Phosphodiesterverbindungen, wie entsprechende Versuche ergaben. Dabei findet eine asymmetrische Spaltung statt, aus der AMP und ATP als Produkte resultieren. Bei längerer Einwirkung oder höherer Konzentration des Enzym, wird auch das ATP über ADP weitergespalten, bis als Endprodukt nur noch AMP vorliegt.

Der Verlauf einer Kernkinetik nach Standardbedingungen wurde unter dem Einfluß der Phosphodiesterase zwar deutlich verringert, erbrachte aber mit geeigneten Konzentrationen noch einen linearen Verlauf. Kontrollgradienten zeigten, daß die Radioaktivität ebenfalls in Material eingebaut wurde, das mit Ad2-DNA kosed-

mentierte. Damit waren die Ergebnisse prinzipiell mit den übrigen Versuchen vergleichbar und snake-venom-phosphodiesterase stellt ein Mittel dar, um selektiv die Ap_4A -Konzentration während des Versuchs zu verringern

Als geeignet erwies sich eine 1:2 Verdünnung der von Boehringer (Mannheim) gelieferten Enzymsuspension, von der 10 μl zu einem Standardansatz von 200 μl bei Kinetikbeginn gegeben wurden. Anhand von Dünnschichtchromatogrammen wurde überprüft, wie sich die Ap_4A -Konzentration während des Versuches veränderte. Nach Ablauf von 20 min zeigte sich kein Ap_4A mehr auf der Platte, so daß die Menge unter die Nachweisgrenze (ca. 1 nmol) gesunken war. Abb. 4.10. zeigt den Vergleich der vier verschiedenen Ap_4A -Konzentrationen:

Kinetiken unter Phosphodiesterase-Einwirkung

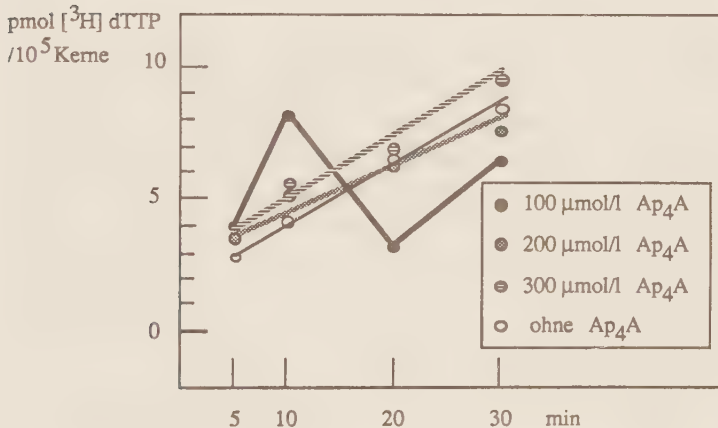


Abb. 4.10.

Lediglich die Kinetik mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ap_4A zeigte einen nicht linearen Verlauf. Eine Stabilisierung des Einbaus war erst bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ Ap_4A zu erkennen. Bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ Ap_4A sieht man eine geringfügige Erhöhung der Einbaurates. Sie ist aber zu gering, um als Stimulation gelten zu können. Der Vergleich mit der Kinetik für 200 $\mu\text{mol/l}$ Ap_4A legte den Schluß nahe, daß eine Mindestkonzentration erhalten bleiben muß, um den

Stabilisierungseffekt zu erreichen. Eine kurzzeitige Einstellung dieser Mindestkonzentration am Beginn der Kinetik schien nicht auszureichen. Daher sollte Ap₄A unmittelbar und andauernd an der Stimulation oder Stabilisierung des [³H]-dTTP-Einbaus beteiligt sein.

Die Interpretation der Ergebnisse unter der Einwirkung der Phosphodiesterase wird durch die wenig spezifische Hydrolysecharakteristik des Enzym erschwert. Große Mengen an Ap₄A könnten einen protektiven Effekt dadurch ausüben, daß sie das Enzym absättigen und so daran hindern, normale Phosphodiesterbindungen anzugreifen. Da die erreichbaren Gesamtsyntheseraten immer noch deutlich unterhalb der Kontrollen liegen, kann man diesen einfachen Neutralisierungseffekt nicht ausschließen.

Phosphodiesterase und Proteinbiosyntheseinhibitoren kombiniert

Eine Vorbehandlung der Zellen mit den Proteinbiosyntheseinhibitoren Cycloheximid und Anisomycin erbrachte keine wesentlichen Veränderungen der Ergebnisse. Wurden den Replikationsansätzen snake-venom-phosphodiesterase zugesetzt, so reduzierte sich die Totalsyntheserate auf ca. 3 pmol [³H]-dTTP / 10⁵ Kerne, das Gesamtbild blieb aber analog Abb. 4.10. erhalten.

Wieder zeigten höhere Ap₄A-Konzentrationen eine größere Tendenz zu linearem Kinetikverlauf, eine Stimulation war nicht feststellbar. Die unter diesen Bedingungen induzierten Schäden der Replikation ließen, wie der drastisch reduzierte Gesamteinbau zeigt, kaum noch DNA-Synthese zu, so daß das Ausbleiben einer Stimulation nicht verwunderlich ist.

Rekonstitution des Genoms aus Ad2-DNA Fragmenten

4.3. Eigenschaften von Typ III Restriktionsenzymen

Typ III Restriktionsenzyme (sie werden von Kessler, 1985 den Typ II Enzymen, bei Winnacker, 1984 aber den Typ III Enzymen zugerechnet) erkennen eine bestimmte Nukleotidsequenz auf der DNA, spalten jedoch in einem genau definierten Abstand außerhalb dieser Sequenz. Daraus ergeben sich für jede Spaltstelle individuelle überhängende Nukleotidsequenzen, die eine gezielte Reassoziaton der Frag-

mente in ihrer ursprünglichen Orientierung erlauben. Dieses Prinzip sollte angewendet werden, um biologisch aktive Ad2-DNA aus Restriktionsfragmenten zu rekonstituieren.

4.3.1. Spaltungscharakteristik von Hga I

Das Typ III Enzym Hga I erkennt auf der DNA ein Pentanukleotid und spaltet im Abstand von fünf, bzw. zehn Nukleotiden die DNA:

Erkennungssequenz von Hga I:



Der mit fünf Nukleotiden ausreichende Überhang ist somit für die Rekonstitution des Doppelstranges geeignet. Als dieses Enzym ausgewählt wurde, stand die Sequenz von Ad2 noch nicht vollständig zur Verfügung; es war lediglich bekannt, daß dieses Enzym mehr als 50 Schnittstellen auf Ad2-DNA erkennt (Kessler, persönliche Mitteilung).

4.3.2. Abschätzung der Wiederholungshäufigkeit von überhängenden Endsequenzen

Jede Schnittstelle kann eine von $1024 (4^5)$ möglichen Pentanukleotidsequenzen erzeugen. Die Gesamtzahl der Schnittstellen ist durch die Anzahl der vorhandenen Pentanukleotide gegeben, die das Enzym erkennt. Errechnet man diese Häufigkeit für ein Enzym, das wie Hga I eine assymetrische Sequenz von fünf Nukleotiden erkennt, so erhält man für eine DNA von der Größe von Ad2-DNA statistisch 70 Fragmente.

Das entspricht auch einer Zahl von 70 Pentanukleotiden, die aus den 256 möglichen Endsequenzen stammen. Eine statistische Abschätzung über die Wahrscheinlichkeit identischer Pentanukleotide an verschiedenen Restriktionsfragmenten ist nicht in der einfachen Weise möglich, wie für die Anzahl der Schnittstellen; sie erfordert eine etwas kompliziertere Statistik. In der Mathematik ist ein analoges Problem beschrieben und gelöst worden. Es handelt sich um das sogenannte

"Geburtsstagsproblem", bei dem es darum geht zu bestimmen, wieviele Personen aus einer Gesamtzahl n am gleichen Tag Geburtstag haben (Engel, 1973, Puckelsheim F., Lehrstuhl für Stochastik und ihre Anwendung, mathematische Fakultät der Universität Augsburg, persönliche Mitteilung).

Die Analogie wird klar, wenn man statt der möglichen 365 Tage des Jahres 1024 mögliche Pentanukleotide einsetzt und statt der Zahl der Personen (n) die Zahl der entstandenen Fragmente verwendet (70).

Dann läßt sich die Formel für das Geburtsstagsproblem folgendermaßen formulieren:

$$P = \left(1 - \frac{4^x (4^x - 1) (4^x - 2) \dots (4^x - n + 1)}{4^{x \cdot n}} \right) \cdot 100$$

wobei x gleich der Zahl der überhängenden Nukleotide und n gleich der Gesamtzahl der Fragmente ist. Da der Quotient die Wahrscheinlichkeit dafür angibt, daß keine identischen Fragmentenden auftreten, muß man die Differenz zu 1 bilden, um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten gleicher Enden zu erhalten. Die Multiplikation mit 100 dient dazu, die Wahrscheinlichkeit (p) in Prozent (P) auszudrücken. Man kann daraus leicht die Grenzbedingungen ableiten, die ein Enzym-DNA System erfüllen sollte, um singuläre Fragmentenden zu erhalten:

Bei einem Restriktionsenzym, das ein Pentanukleotid erzeugt, erwartet man für 37 Fragmente mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% mindestens zwei identische Endsequenzen. Ein Enzym mit dieser Schnitt-Charakteristik für Ad2-DNA kann man bislang aber nicht kommerziell erhalten.

Erzeugt das Restriktionsenzym nur ein Tetranukleotid am Fragmentende, so erhält man für 18 Fragmente eine 50 prozentige Wahrscheinlichkeit für das Auftreten doppelter Endsequenzen. Ein entsprechendes Enzym war zum Zeitpunkt dieser Studien ebenfalls nicht verfügbar.

Mit die günstigsten Voraussetzungen unter den käuflichen Enzymen schien das Enzym Hga I zu haben, das ein Pentanukleotid als Überhang erzeugt. Alle anderen wiesen nur vier endständige ungepaarte Nukleotide auf, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit für störende Doppelgänger noch erhöht.

Setzt man in die Formel die Werte für Hga I ein ($n = 70$, $x = 5$), so errechnet sich eine Wahrscheinlichkeit von 91% für das Auftreten eines Paares identischer Frag-

mentenden. Als Folge davon würde eine *in vitro* Rekonstitution nur teilweise richtig orientierte Virus-DNA liefern können. Es war ein Gemisch zu erwarten, das einen nicht exakt vorherbestimmbaren Anteil intakter Ad2-DNA enthielt.

Um aus diesem intakte Ad2-DNA zu gewinnen, war eine biologische Selektion unumgänglich. Diese bestand darin, HeLa-Zellen mit dem ligierten DNA-Gemisch zu transfizieren. Nur die korrekt rekonstituierten Moleküle sollten infektiös sein und sich vermehren. Die Richtigkeit dieser Hypothese sollte nun in einem experimentellen Ansatz geklärt werden.

Das prinzipielle Vorgehen für Rekonstitutionen mit Typ III (oder IIb) Restriktionsendonukleasen ist für alle Enzyme gleich und ist in der Abb. 4.11. skizziert. Basierend auf diesem Schema sollte es möglich sein, eine beliebige Mutation gezielt an jeder Stelle in das Ad2-Genom oder eine andere DNA vergleichbarer Größe einzuführen. Dabei muß es sich nicht zwingend um eine Punktmutation handeln, auch mutierte Bereiche können auf diese Weise in das Ad2-Genom eingebracht werden. Voraussetzung ist lediglich, daß die Integrität der Verbindungsstellen gewahrt bleibt.

Das Schema berücksichtigt die oben angesprochene Selektion nicht, da diese lediglich aus technischen Gründen erforderlich war und nichts mit dem Prinzip der Methode zu tun hat. Es war zum damaligen Zeitpunkt kein Enzym verfügbar, das auf Adenovirus Typ 2 DNA nur singuläre Fragmentenden erzeugt. Selbstverständlich muß sich die Effizienz des Verfahrens reduzieren, wenn ein großer Teil des Ligaseansatzes in der Selektion ausgesondert wird.

Dieser Nachteil entfällt für jede DNA, für die ein geeignetes Typ III Restriktionsenzym vorhanden ist, das die Rekonstitution ohne Selektionsdruck erlaubt. Unter dieser Voraussetzung kann man das Experiment wie in der Abb. 4.11. dargestellt ausführen.

DNA-Rekonstitution mit Typ III Restriktionsendonukleasen

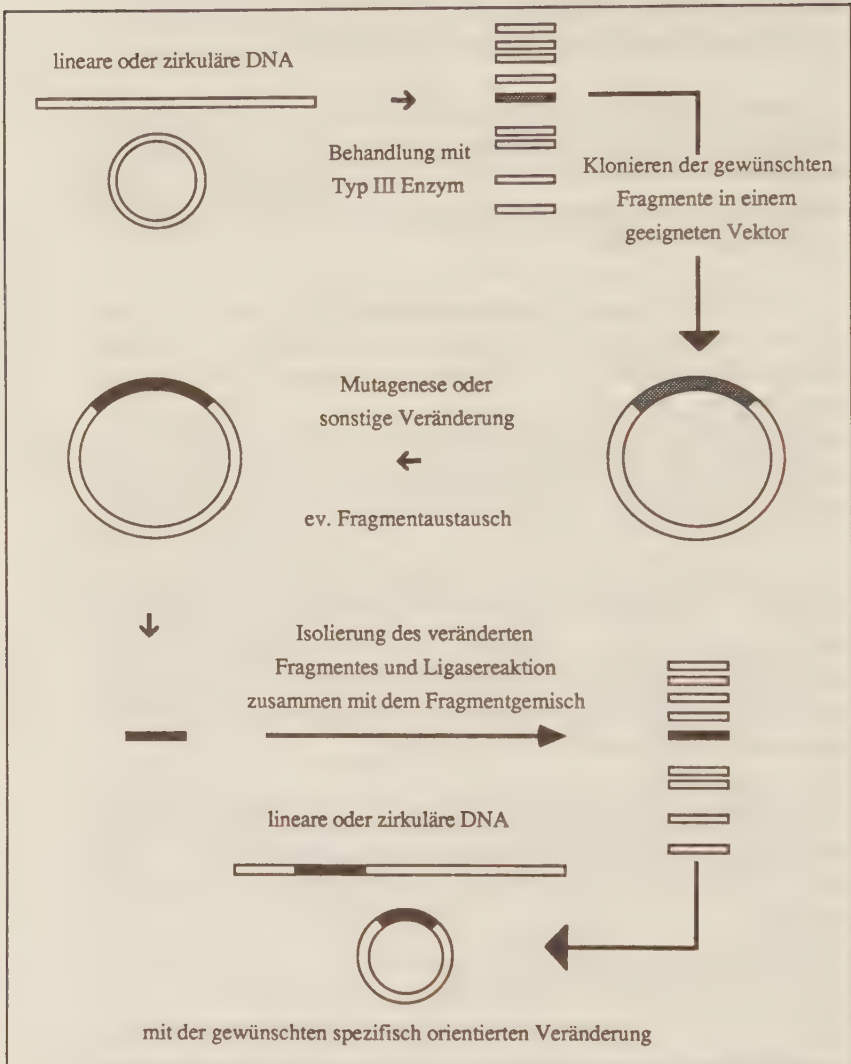


Abb. 4.11.

4.4. Mutation im terminalen Protein von Ad2 (Fok-I-System)

Bedauerlicherweise erwies sich das Enzym Hga I für die praktische Durchführung nicht als geeignet, da es nicht möglich war, Ad2-DNA mit diesem Enzym vollständig zu spalten. Auch lange Inkubationszeiten, hohe Enzymaktivitäten und verschiedene DNA-Präparationen von Ad2-DNA zeigten stets ungeschnittene DNA von mindestens halber Genomgröße in einem Umfang von fünf bis zehn Prozent.

Wie Transfektionsversuche mit HeLa-Zellen ergaben, war die ungespaltene DNA-Menge ausreichend, um Virus zu produzieren. Damit wurde die Unterscheidung zwischen dem Effekt der ungespaltenen DNA und religierter DNA unmöglich und Hga I schied als geeignetes Enzym aus.

Spaltungscharakteristik von Fok I

Als Alternative wurde das Enzym Fok I gewählt, das ebenfalls eine fünf Nukleotide lange Sequenz erkennt und neun, bzw. dreizehn Nukleotide dahinter spaltet:

Erkennungssequenz von Fok I:



Es erzeugt 4 überhängende Nukleotide und war sollte Ad2-DNA ebenfalls mehr als 50 mal schneiden. Die Rechnung ergibt analog Hga I 70 Fragmente und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten identischer Fragmentenden steigt auf 99,9%. Wiederum kann nur der Selektionsdruck nach der Transfektion die richtigen DNA-Moleküle auswählen.

Defekte DNA, wie sie etwa aus Ligasereaktionen zwischen zwei identischen Fragmentenden in falscher Orientierung resultiert, sollte nicht in der Lage sein, zu einer Infektion der transfizierten Zelle zu führen. Somit kann man erwarten, daß sich nur die richtig religierte Ad2-DNA vermehrt und als Virus freigesetzt wird.

Um sicherzustellen, daß dies auch tatsächlich der Fall ist, wurden vor der Konstruktion der Mutante eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Sie sollten die Funktionsfähigkeit des Systems untermauern.

4.4.1. In vitro Religierung von Ad2-DNA aus Fok I-Fragmenten

Ad2-DNA wurde, wie unter 3.3.2. beschrieben, isoliert und mit 5 u Fok I / μg DNA gespalten (4h bis über Nacht). Anfänglich traten ähnliche Schwierigkeiten wie im Falle von Hga I auf, sie konnten bei dem Enzym Fok I aber durch Verlängerung der Inkubationszeit überwunden werden.

Die Fragmente wurden 2x phenolisiert (wie unter 3.10.1. beschrieben), das Restphenol 3x mit Ether extrahiert und eine Ethanolfällung durchgeführt. Das Pellet wurde im Reaktionspuffer für die Austauschmarkierung gelöst und eine 5'-Markierung mit [^{32}P]-ATP durchgeführt (siehe 3.10.6.). Danach erfolgte eine erneute Phenolisierung und Ethanolfällung.

Das Pellet wurde in einem Gesamtvolumen von 150 μl mit 20 u T4-DNA-Ligase bei 16 °C für einen Zeitraum von 12 Tagen inkubiert. Zwischenkontrollen ergaben, daß die Ligasereaktion vor dem Ablauf von zehn Tagen noch nicht abgeschlossen war. Nach zwölf Tagen war keine Verbesserung der Ligaseausbeute mehr feststellbar.

Dieser Ligaseansatz wurde dann über einen alkalischen Sucrosegradienten zusammen mit einem ^{14}C -Ad2-DNA Marker aufgetrennt. Die Analyse des Gradienten erfolgte nach der Fraktionierung und Fällung mit TCA auf GF/C-Glasfilter durch Szintillationszählung der Filter (siehe hierzu 3.11.5. und 3.11.6).

Zur Kontrolle wurde ein analoger Ansatz mit dem Restriktionsenzym Hind III durchgeführt, mit dem Unterschied, daß hier die Inkubationszeit für die Ligase ca. 18 h betrug. Die Ad2 Fragmente wurden durch Austauschmarkierung (siehe 3.10.6.) 5'-[^{32}P]-markiert. Die Fok I Fragmente wurden 12 Tage ligiert, die unligierten Fok I Fragmente wurden ebenfalls 12 Tage mit Ligasepuffer inkubiert, jedoch ohne Enzym.

Bei den Hind III Spaltungen reichte eine Ligasezeit von 2 Tagen aus; schon nach einem Tag ergab sich ein ähnliches Muster, so daß eine längere Inkubation nicht erforderlich war. Auch in diesem Fall wurden die Fragmente gleich behandelt und mit bzw. ohne Ligase inkubiert.

Religierung von Ad2 Fok I Fragmenten

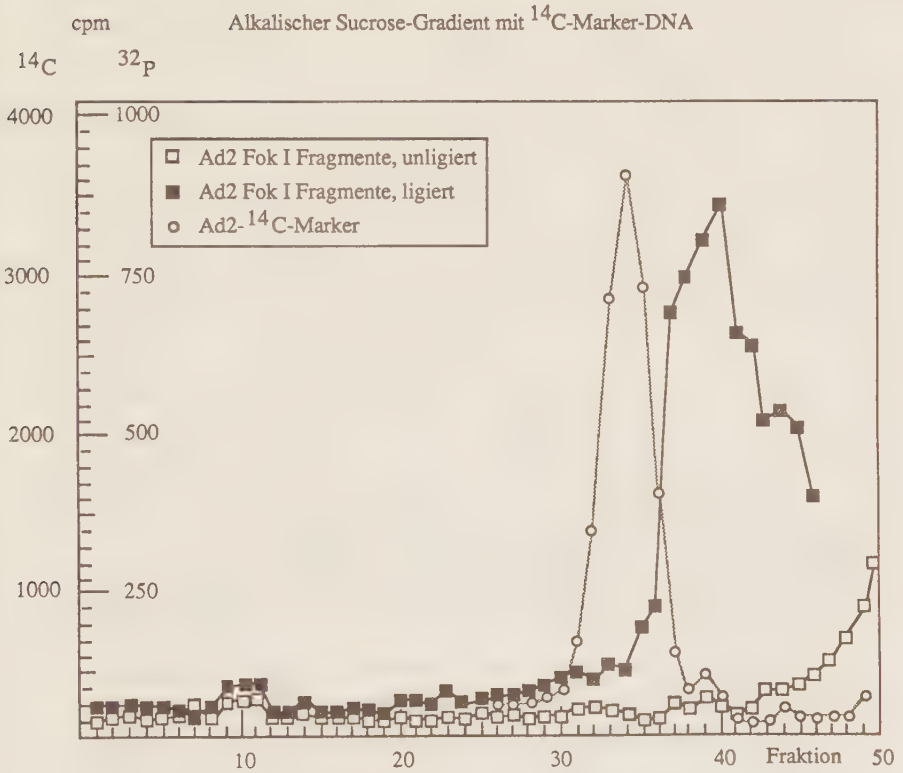


Abb. 4.12.

Religierung von Ad2 HindIII Fragmenten

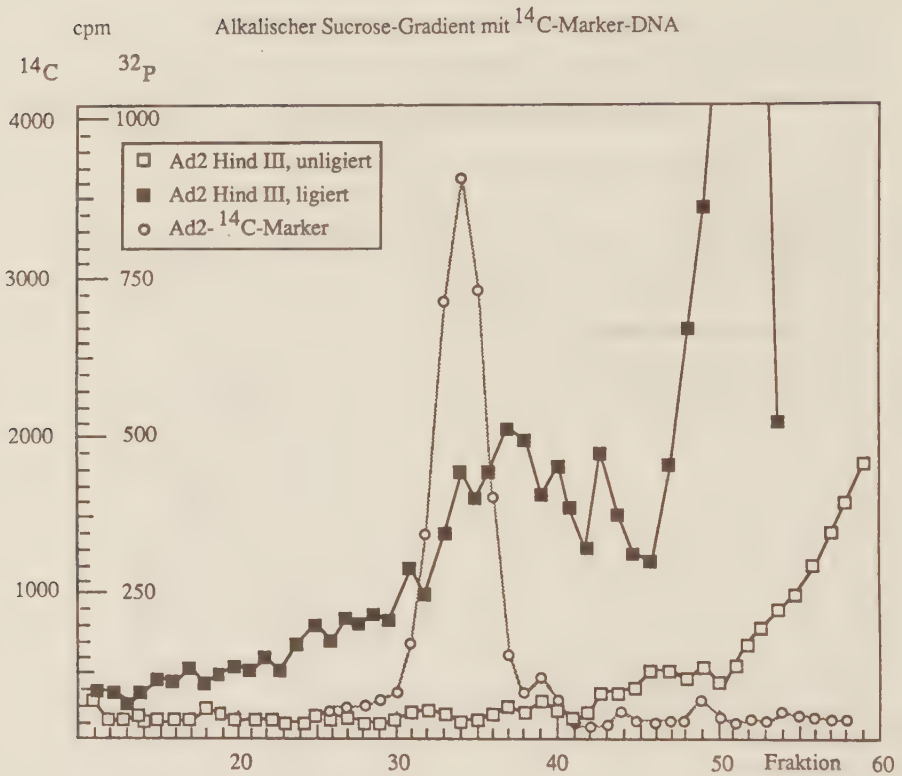


Abb. 4.13.

Das Ergebnis zeigen die Abbildungen 4.12. und 4.13., aus denen klar zu sehen ist, daß der Kontrollversuch mit dem Enzym Hind III zusammenhängende DNA-Stücke lieferte, die weit über die Genomgröße von Ad2-DNA hinausgehen; zudem ist keine Selektion auf eine bestimmte Größe ersichtlich. Im Fall der religierten Fok I Fragmente dagegen tritt eine sehr scharfe Begrenzung der maximalen Größe auf, die mit der Genomgröße von Ad2-DNA korreliert. Allerdings erreicht nur ein kleiner Teil der rekonstituierten DNA-Moleküle wirklich die genomische

Größe von Ad2-DNA. Ein großer Prozentsatz findet sich mit hoher Priorität im subgenomischen Bereich, jedoch deutlich von den unligierten Fragmenten abgesetzt.

Das entspricht durchaus den Erwartungen aus der oben erläuterten Statistik. Nachdem diese Versuche erwiesen, daß zumindest die Selektion gegen Aggregate über Genomgröße hinaus wirksam ist, mußten Transfektionsversuche zeigen, ob der Anteil an rekonstituierten Ad2-DNA Molekülen für eine erfolgreiche Transfektion ausreichend ist.

4.4.2. Transfektion von HeLa-Zellen mit rekonstituierten Ad2 Fok I Fragmenten

Die Spaltung und Ligase-Reaktion wurde analog 4.2. durchgeführt, lediglich die ^{32}P -Markierung entfiel. Parallel dazu wurden die Fragmente ohne Ligase als Kontrolle inkubiert. Mit beiden Ansätzen, sowie einer intakten Ad2-DNA als Vergleich wurden dann Transfektionen nach Sharp (1976) durchgeführt, wie in 3.5. beschrieben. Nach den Transfektionen wurden folgende Analysen durchgeführt:

Von den Überständen der Petrischalen wurden nach der angegebenen Anzahl von Tagen Plaque-Tests nach 3.6. durchgeführt. Die Infektion der HeLa-Zellen wurde durch Immunfluoreszenz verfolgt und nach erfolgter Lyse der Zellen wurde eine weitere Viruspassage über Monolayer nach 3.2.1 vorgenommen, und das nach 3.2.3. isolierte Virus im CsCl-Gleichgewichtsgradienten untersucht.

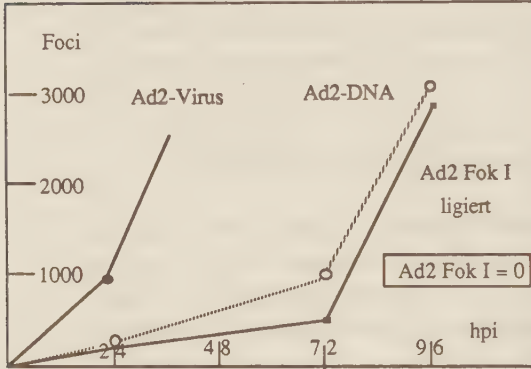
Die Ergebnisse sind in der Abb. 4.14. zusammengestellt: Man sieht eine gute qualitative und quantitative Korrelation zwischen dem Verhalten der ligierten Ad2 Fok I Fragmenten und intakter Virus-DNA. Die Kontrollfragmente ohne Ligasebehandlung riefen keine entsprechenden Veränderungen in den HeLa-Zellen hervor.

Es gelang nicht in allen Fällen, positive Kontrolle mit Ad2-DNA vorausgesetzt, aus den Transfektionen Virusproduktion zu bekommen. In zwei Fällen erfolgte die Infektion der transfizierten HeLa-Zellen auch mit den unligierten Fragmenten, wenn auch mit einer Verzögerungs-Phase von zwei, bzw. drei Tagen gegenüber den ligierten Fragmenten oder intakter Ad2-DNA. Das Transfektionsverhalten der ligierten Fragmente, das mit dem von authentischer Ad2-DNA identisch war, konnte niemals bei unligierten Fragmenten beobachtet werden.

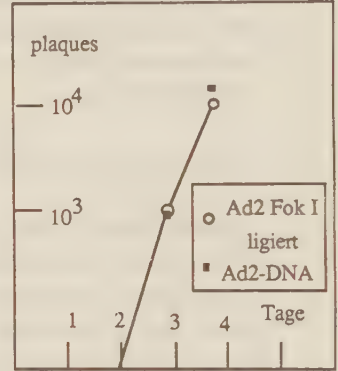
Ergebnisse der Transfektionen von HeLa-Zellen mit religierter Ad2-DNA

Ad2-DNA mit Fok I gespalten und mit T4-DNA-Ligase rekonstituiert

Immunfluoreszenz



Plaque-Test



Effekte nach der Transfektion von HeLa-Zellen

Effekt	Ad2 Fok I Fragmente	Ad2 Fok I Fragmente,ligiert	Ad2-DNA
Foci in der Immunfluoreszenz	-	+	+
cytopatischer Effekt	-	+	+
positiver plaque-Test	-	+	+
Kosedimentation mit Ad2- Virusmarker im CsCl- Gleichgewichtsgradienten	-	+	+

Abb. 4.14.

Die erhaltenen Daten sind ein Hinweis darauf, daß die Selektionskriterien der Transfektion mit anschließender Virusgewinnung ausreichen, um die richtig rekonstituierten Ad2 Genome aus dem Ligaseansatz von den fehlerhaft ligierten DNA-Molekülen abzutrennen.

Daher sollte der endgültige Beweis in Form einer Mutante erbracht werden, deren Marker sich dann in den rückisolierten Viren nachweisen ließ.

4.4.3. Auswahl der Mutation und Strategie der Mutagenese

Das terminale Protein von Ad2 spielt eine zentrale Rolle in der Replikation der Virus-DNA, weshalb es als erstes Objekt für die gezielte Mutagenese ausgewählt wurde. Es wird in Form eines Vorläuferproteins auf einem DNA Segment kodiert, das sich von 8 575 bis zur Position 10 534 erstreckt. Es liegt damit relativ zentral im Eco RI A Fragment. Damit bot sich eine neue Eco RI Stelle als Mutationsmarker geradezu an, durch die sich die Mutation sehr leicht auf der DNA-Ebene nachweisen läßt. Folgende Sequenz wurde gewählt:

Basenaustausch bei der Mutante pJM 1 Eco

Wildtypsequenz (8842) 5' - CGT CTC CTG AGT TGT CTT GA - 3' (8861)

* *

Mutante 5' - CGT CTC CTG AAT TCT CTT GA - 3'
(Oligonukleotid TW 1)

Austausch auf der Ebene der Aminosäuren (angegeben ist der Strang, dessen Sequenz mit der m-RNA identisch ist; Gegenstrang zu obiger Sequenz):

Wildtypsequenz 5' - CAA GAC AAC TCA GGA GAC - 3'
 Gln Asp Asn Ser Gly Asp

■

Mutante 5' - CAA GAG AAT TCA GGA GAC - 3'
 Gln Glu Asn Ser Gly Asp

Das entsprechende DNA-Fragment kann mit Hilfe anderer Restriktionsenzyme isoliert und subkloniert werden. Das ermöglicht eine Mutagenese des Fragments mit einem der für Plasmide beschriebenen Verfahren. Über die Fok I Schnittstellen, die in dem Fragment enthalten sind und den entsprechenden Schnittstellen auf Adenovirus Typ 2 DNA sollte es dann möglich sein, die Mutation *in vitro* in das Adenovirus-Genom einzubringen.

Wenn es gelingen soll, mutiertes Virus in reiner Form zu isolieren, darf die Mutation nicht letal sein, sonst kann es nicht ohne Helfer wachsen. Um eine zu große Beeinträchtigung der Funktion des Proteins also möglichst zu vermeiden, sollte die Sequenz-Veränderung nur geringen Einfluß auf die Proteinzusammensetzung haben. Durch die neue Eco RI Stelle wird nur eine Aminosäure betroffen, ein Asparat wird in ein Glutamat umgewandelt. Dieser Austausch einer einzigen Aminosäure gegen eine vergleichsweise ähnliche dürfte keine allzu große Veränderung des Proteins bewirken. Die beiden Punktmutationen sollten als Bestandteil des auf Seite 71 angegebenen Oligonukleotids in die DNA eingebracht werden.

Falls diese Mutation dennoch das Protein deaktivieren sollte, so könnte die mutierte DNA trotzdem in Virionen verpackt werden, da das terminale Protein eine Transfunktion erfüllt, die durch den Wildtyp komplementiert werden kann.

Als Mutagenese-Methode wurde das Verfahren nach Zoller + Smith (siehe 3.15), in etwas modifizierter Form, gewählt. Da es als Ausgangsmaterial einen Einzelstrang erfordert, mußte die zu mutierende Sequenz in einem geeigneten Vektor kloniert werden. Daraus sollte das entsprechende Fok I Fragment nach der Matagenese wieder isoliert werden können und dann in einem Ligaseansatz mit den übrigen Ad2 Fok I Fragmenten zusammengesetzt werden (siehe oben).

Der gesamte Ablauf der Mutagenese ist in der Abb. 4.15. schematisch zusammengefaßt:

Strategie der Klonierung und Mutagenese von pJM 1

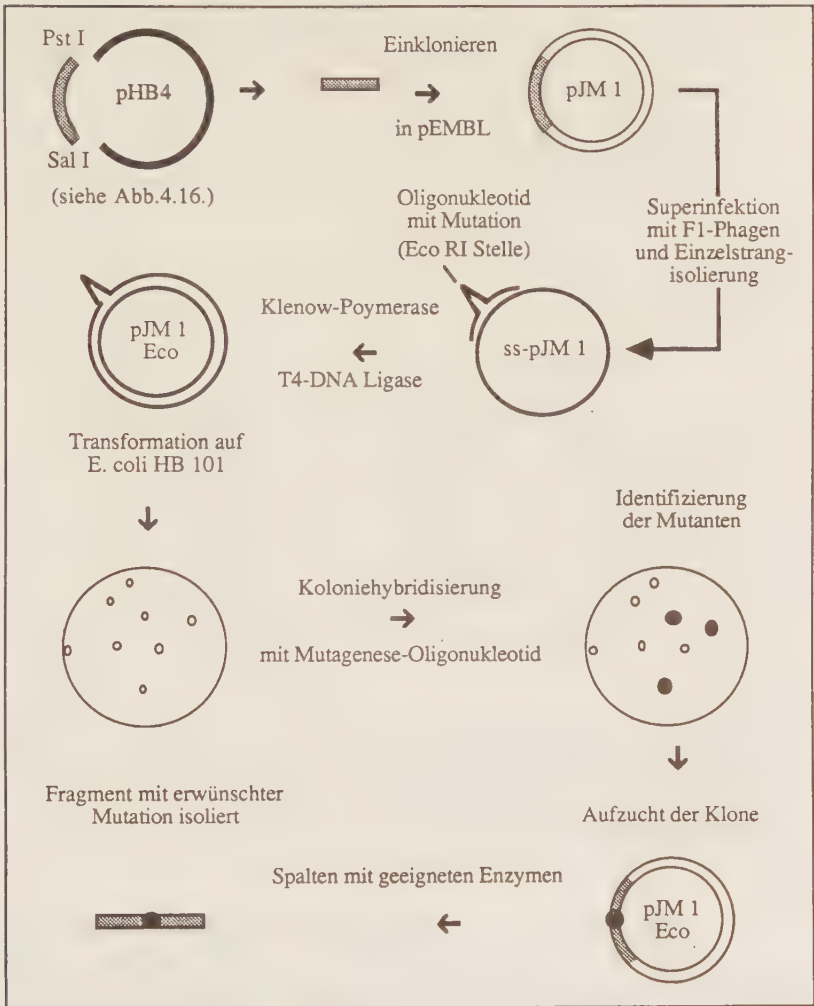
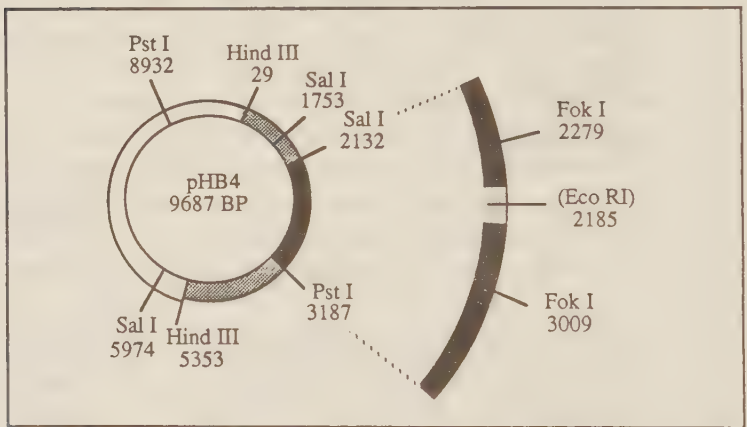


Abb. 4.15.

4.4.4. Subklonierung eines Ad2-Fragmentes in den Vektor pEMBL

Zunächst wurde als Vektor für die Einzelstrangklonierung der Phage M13 mp8 gewählt und dessen Doppelstrangform nach dem BRL-Manual isoliert. Es war jedoch nicht möglich das gewünschte Fragment (Pst I - Sal I Fragment aus pHB4, 1055 Bp, siehe Abb. 4.16.) in stabiler Form in die Phagen-DNA zu integrieren. Es konnten entweder keine Klone mit dem gewünschten Insert gefunden werden, oder die rekombinanten Phagen deletierten das Insert während der Aufzucht wieder.

Das Plasmid pHB4 mit den wichtigsten Schnittstellen



Das Plasmid pHB4 leitet sich von pBR 322 ab, in dessen Hind III Stelle das Hind III B Fragment von Ad2 einkloniert wurde. In der Abbildung sind außerdem die beiden flankierenden Fok I Stellen zu der geplanten Eco RI Stelle eingezeichnet. Abb. 4.16.

Daher wurde auf einen anderen Vektor, pEMBL ausgewichen, der sich als Plasmid vermehren läßt. Nach Superinfektion mit F1-Phagen wird auch das Plasmid einzelsträngig verpackt, da es die notwendigen Sequenzen des Phagen trägt (intergene Region). Zur Klonierung wurde das Fragment (Pst I-Sal I 1055 BP, siehe Abb. 4.16.) von pHB4 aus einem Agarosegel (1%), wie in 3.14.7. beschrieben,

isoliert. Die Stelle, über die das Protein mit der Ad2-DNA verknüpft wird, und die geplante Mutationsstelle, werden von zwei Fok I Stellen flankiert, die sich beide innerhalb des ausgewählten Pst I, Sal I Fragmentes befinden. Das gewährleistete, daß sich aus dem Plasmid pJM 1 nach der Mutagenese das benötigte Fok I Fragment wieder in intakter Form isolieren ließ. Analog wurde der Vektor mit den beiden Enzymen Pst I und Sal I geöffnet und gleichfalls über ein Agarose-Gel isoliert.

Die beiden gereinigten DNA-Fragmente wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5 u T4-DNA-Ligase über Nacht ligiert, bei einer Konzentration von ca 100 pmol/l Fragmentenden. Es wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 1:5 eingesetzt. Der Ansatz wurde auf kompetente E. coli HB101 Zellen transformiert, wie unter 3.12.4. beschrieben. Die resultierenden Klone wurden durch Schnellaufschlüsse (3.14.2.) untersucht und ein Klon mit dem richtigen Insert aufgezogen. Der Klon erhielt die Bezeichnung pHPS.

Da sich HB101 Zellen nicht mit dem Phagen F1 infizieren lassen, wurde das Plasmid pHBS isoliert und in JM 103 Zellen umklontiert (Bereitung kompetenter JM 103 Zellen erfolgte analog den E. coli HB101, die JM 103 Zellen wurden aber nur frisch verwendet, da sie bei -80° C sehr rasch ihre Kompetenz einbüßten). Der hieraus resultierende Plasmid im JM 103 Stamm erhielt die Bezeichnung pJM 1.

Das Plasmid aus pJM 1 wurde hinsichtlich seines Inserts nochmals eingehend mit Restriktionsenzymen charakterisiert und zeigt in allen Fällen das erwartete Restriktionsmuster. Daraufhin wurde die einzelsträngige Form des Plasmids mittels F1 Superinfektion nach 3.14.4. isoliert.

Es war hierbei von Bedeutung, daß vor der Infektion mit dem Phagen zwei Passagen des Klons auf Minimalagarplatten mit Ampicillin erfolgten. Dadurch ließ sich die Ausbeute an einzelsträngigem Plasmid, relativ zu der Gesamtmenge an einzelsträngiger DNA, bis auf 50% steigern. Bei direkter Infektion mit dem Phagen in YT-Medium schwankte sie zwischen 10% und 30%.

4.4.5. In vitro Mutagenese des Plasmids pJM 1

Für die Mutagenese wurde ein Oligonukleotid von 20 Nukleotiden Länge synthetisiert (DNA-Synthesizer), das der oben angegebenen Sequenz entsprach (siehe S 71). Die Reinigung und Phosphorylierung des Rohproduktes erfolgte wie unter 3.11.2. beschrieben. Das Oligonukleotid erhielt die Bezeichnung TW1.

Anschließend wurden 20 pmol des gereinigten und 5'-phosphorylierten Oligonukleotids TW1 zusammen mit 20 pmol des einzelsträngigen Templates in einem Ansatz von 20 μ l nach Zoller + Smith eingesetzt (siehe hierzu 3.15.). Nach Beendigung der Reaktion wurde in den entscheidenden Versuchen auf die Abtrennung des Einzelstranges über den Sucrosegradienten verzichtet, und der Ansatz direkt auf kompetente HB101 transformiert.

Die Analyse der Klone erfolgte durch Koloniehybridisierung nach Grunstein and Hognes (1975) mit dem 5'- 32 P-markierten Oligonukleotid TW1 (Markierung siehe 3.10.5). Der erste Film wurde üblicherweise nach dem dreimaligen Waschen bei Raumtemperatur aufgelegt, dann erst stringent nachgewaschen, wobei der Hintergrund merklich zurückging, während die Signale voll erhalten blieben. Ein Beispiel zeigt Abb. 4.17:

Radioaktive Markierung von Koloniehybridisierungen mit Oligonukleotiden

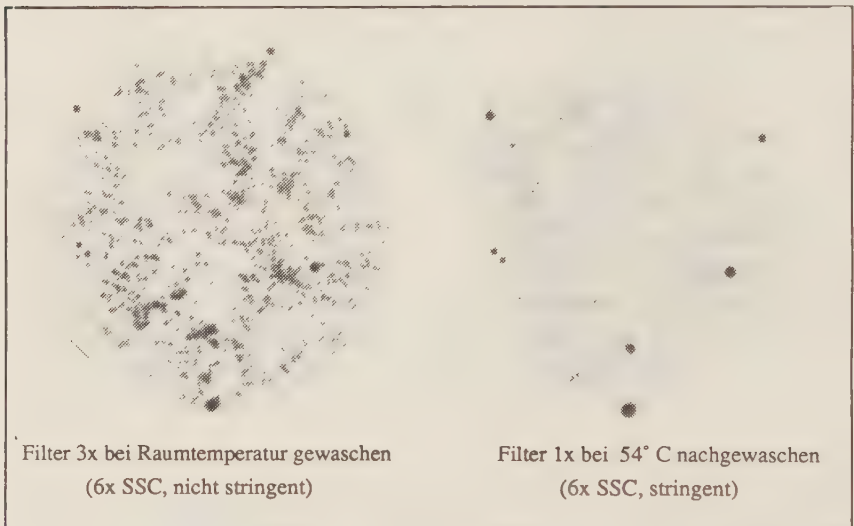


Abb.4.17.

Die positiven Klone wurden einer Analyse durch Schnellaufschlüsse unterzogen und nach Bestätigung der neuen Schnittstelle aufgezüchtet. Das so erhaltene Plas-

mid, das die gewünschte neue Eco RI Stelle trägt, erhielt die Bezeichnung pJM 1 Eco. Es wurde zunächst in einem Mischklon zusammen mit dem Wildtyp-Plasmid erhalten, weshalb das Restriktionsmuster nicht eindeutig war.

Durch erneutes Umtransformieren des Mischplasmides wurde das gereinigte Plasmid erhalten. Daneben fanden sich auch Klone, die den Wildtyp enthielten und Klone, die beide Plasmide in verschiedenen Mengenverhältnissen aufwiesen.

Southern-Blot von pJM 1 Eco

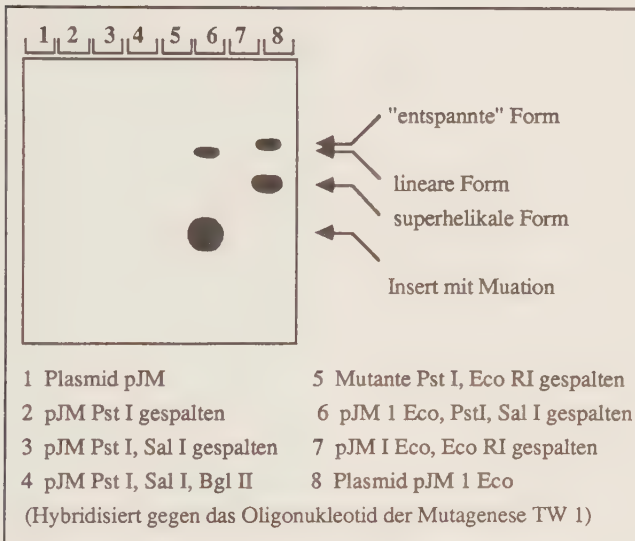


Abb. 4.18.

Das Plasmid pJM 1 Eco wurde zusätzlich zu seinem Restriktionsmuster noch durch einen Southernblot charakterisiert und bestätigt. Der Blot wurde mit dem 5'-³²P-markierten Oligonukleotid TW 1 hybridisiert (Bedingungen der Hybridisierung siehe 3.12.6.). Man sieht in Abb. 4.18. deutlich, daß das Insert, die lineare (unvollständige Spaltung in Spur 6), die superhelikale und die zirkuläre Form des Plasmides hybridisieren; durch die Behandlung mit Eco R I verschwindet das Signal im Insert vollständig (Spur 7), da Eco RI innerhalb der Oligonukleotidsequenz

spaltet. Die verbleibenden Fragmente überlappen nicht mehr weit genug mit dem Oligonukleotid, um unter den angewendeten Bedingungen stabile Hybride zu bilden.

4.4.6. Rekonstitution von Ad2 Fok I Fragmenten mit PJM 1 Eco

Gereinigte Ad2 Fok I Fragmente (nach 3.10.1) wurden zusammen mit dem isolierten Fok I Fragment aus PJM 1 Eco, das die neue Eco RI Stelle enthält, unter den in 3.10.7. beschriebenen Bedingungen ligiert und auf HeLa-Zellen transfiziert. Parallel erfolgte eine Kontrolle des Ligaseansatzes durch einen Southernblot. (Abb. 4.19.)

Wie auf dem Blot zu sehen ist, wurde das Fragment mit der Eco RI Stelle in die wachsende Ad2-DNA eingebaut, wenn auch nur in geringem Maß. Es finden sich dabei auch Fragmente, die deutlich über der Größe des linearen Plasmids liegen, womit eine bloße Reassoziaton von Plasmidkontaminationen ausgeschlossen ist. Trotzdem gelang es nicht, aus den Ligaseansätzen Adenovirus mit der Mutation zu züchten. Die doppelte Selektion, Einbau der konkurrierenden Fragmente (Wildtyp und Mutante) und funktionelle Integrität des entstehenden Moleküls reduzierten die Ausbeute an genomisch intakter Mutante offenbar zu stark.

Prinzipiell bestand auch noch die Möglichkeit, daß die Mutation letal war, was sich aber noch nicht während der *in vitro* Ligierung auswirken konnte. Da bereits hier keine nachweisbaren Mengen mutierter genomischer DNA entstanden, enthielt das Gemisch offenbar zuviel identische Fragmentenden, um noch zusätzlich das mutierte Fragment in die wenigen intakten Genome einzubauen.

Um zum Erfolg zu kommen war es notwendig, die Ausbeute an intakter genomischer DNA in der *in vitro* Ligierung zu erhöhen, wozu das Fok System nicht geeignet war.

Diese Überlegungen, und die Tatsache, daß mittlererweile die DNA-Sequenz von Adenovirus Typ 2 als Datenfile erhältlich war, führten schließlich dazu, das gesamte System auf ein ebenfalls erst neu verfügbares Enzym umzustellen, das aufgrund der Daten für diese Anwendung prädestiniert scheint. Bei der Auswahl der neuen Strategie konnte von den tatsächlichen Verhältnissen ausgegangen werden. Statistische Überlegungen mußten nicht mehr herangezogen werden.

Reassoziation von Ad2 Fok I Fragmenten mit der Mutante pJM 1 Eco

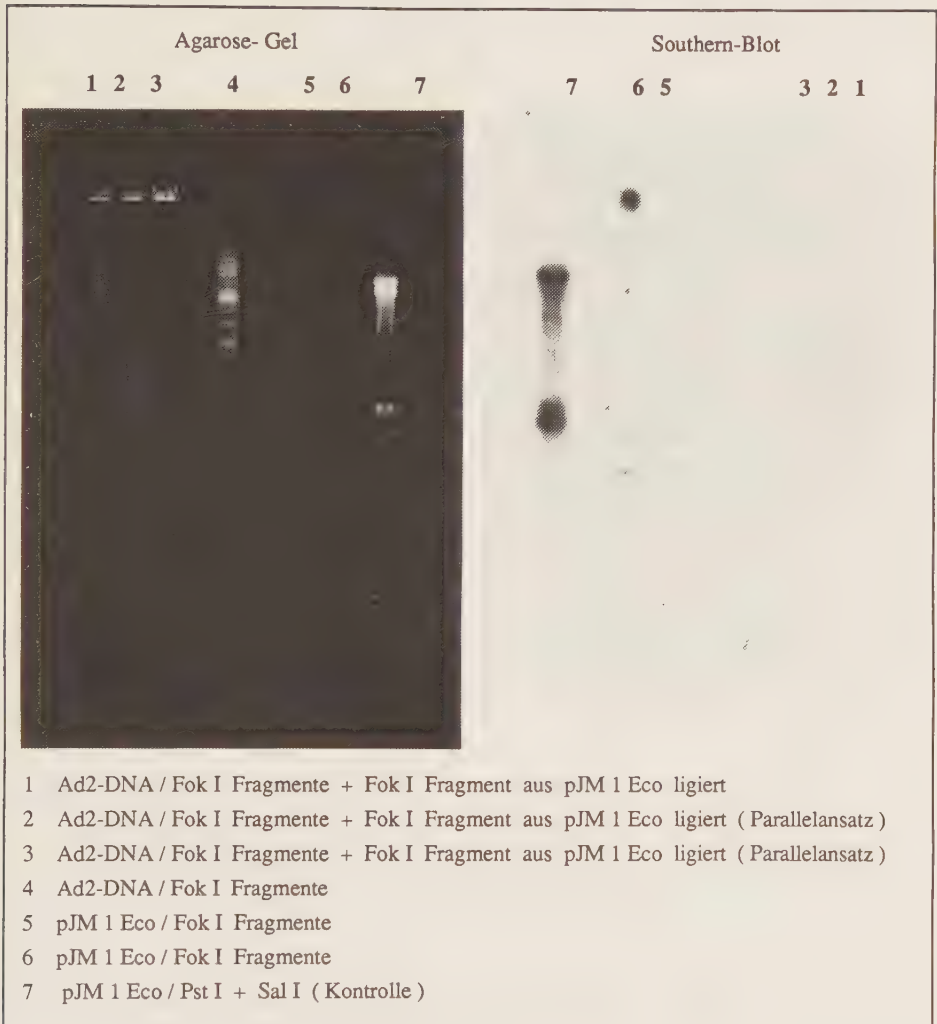


Abb. 4.19.

4.5. Computer-Analyse von Ad2-DNA für Typ III Restriktionsenzyme

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es 13 kommerziell verfügbare Typ III Restriktionsenzyme, die alle Ad2-DNA schneiden. Für eine Rekonstitution von Ad2-DNA kommen die Enzyme Hph I, Mbo II, Mnl I, Nla IV, Tth 111 I und Xmn I nicht in Frage, da sie entweder ohne oder mit zu geringem Überhang schneiden. Das Enzym Bbv I erzeugt so viele Fragmente, daß es ebenfalls ausscheidet.

Untersucht man die Sequenz von Ad2-DNA explizit auf das mehrfache Auftreten von überhängenden Oligonukleotiden, ergibt sich folgendes Bild:

Fok I erzeugt insgesamt 78 Fragmente und dabei acht Paare identischer Schnittstellen, Sfa NI sechs Paare. Daraus läßt sich vermutlich die Problematik der Rekonstitution mit Ad2 Fok I Fragmenten erklären. Auch die Bevorzugung subgenomischer Größen im Sucrosegradienten entspräche den Gegebenheiten.

Wie zu erwarten liegen die Verhältnisse für die Enzyme Bgl I und Hga I, trotz des größeren Überhangs von fünf Nukleotiden bei Hga I (88 Fragmente), bzw nur 21 Fragmenten bei Bgl I, sehr ungünstig. Bgl I erzeugt nicht weniger als fünf Paare identischer Endsequenzen, wobei eine sogar viermal auftritt. Hga I liefert vier Paare identischer Fragmentenden. Die statistischen Abschätzungen erwiesen sich damit als zumindest in erster Näherung zutreffend. Aussagen über die Anzahl doppelter Fragmentenden lassen sich ohne Kenntnis der Sequenz nicht machen, da speziell in diesem Fall die Abweichung der DNA-Sequenz von der statistischen Gleichverteilung zur Geltung kommt. In Tab. 4.1. ist für alle Enzyme die Anzahl der Fragmente aufgeführt, die aus Ad2-DNA erzeugt werden.

Lediglich die Enzyme Sfi I und Bstx I entsprechen den Erwartungen und erzeugen singuläre Endsequenzen an ihren Schnittstellen. Mit nur vier Fragmenten unterteilt Sfi I allerdings das Genom von Ad2 nicht ausreichend, so daß im Endeffekt nur ein einziges Enzym tatsächlich geeignet erscheint: Bstx I, das 11 Fragmente aus Ad2-DNA erzeugt.

In der Tabelle 4.1. sind die genannten Restriktionsenzyme zusammen mit ihren Erkennungssequenzen und der Zahl der Schnittstellen auf Ad2-DNA aufgeführt:

Typ III Restriktionsendonukleasen

Enzymname	Erkennungssequenz	Fragmente aus Ad2-DNA
Bbv I	GCAGC(N) ₈ CGTCG(N) ₁₂ ↓	180
Bgl I	GCCNNNNNGGC CGGNNNNNCCG ↑ ↓	21
Bstx I	CCANNNNNNTGG GGTNNNNNNACC ↑	11
Fok I	GGATG(N) ₉ CCTAC(N) ₁₃	78
Hga I	GACGC(N) ₅ CTGCG(N) ₁₀	88
Hph I	GGTGA(N) ₈ CCACT(N) ₇	100
Mbo II	GAAGA(N) ₈ CTTCT(N) ₇	193
Mnl I	CCTC(N) ₇ GGAC(N) ₇ ↓	397
Nla IV	GGNNCC CCNNGG ↑	179
Sfa NI	GCATC(N) ₅ CGTAG(N) ₉ ↓	85
Sfi I	GGCCNNNNNGGCC CCGGNNNNNCCGG ↑ ↓	4
Tth 111 I	GACNNNGTC CTGNNNCAG ↑ ↓	13
Xmn I	GAANNNNTTC CTNNNNNAAG ↑	6

Tab. 4.1.

4.6. Mutation von Ad2-DNA über die Bstx I Fragmente

4.6.1. Strategie des Bstx I Systems

Die Vorgehensweise unterscheidet sich von der für die Fok I Fragmente angewandten vor allem dadurch, daß das Bstx I Fragment direkt subkloniert wird (Abb. 4.20). Da die Mutation im terminalen Protein und im Eco RI A Fragment liegen soll (Restriktionskarte: Abb. 4.23., S 90), handelt es sich um das Ad2 Bstx I C Fragment (4600 - 9851, 5251 Bp). Bstx I erzeugt singuläre überhängende Oligonukleotide (siehe oben), daher kann der Vektor pUC 12 (Vieira and Messing, 1982) nicht in seiner ursprünglichen Form eingesetzt werden. Der Polylinker muß gegen einen anderen, an die beiden Enden des Ad2 Bstx I C Fragmentes adaptierten, Linker ausgetauscht werden.

Dies sollte mittels zweier Oligonukleotide (TW 2, TW 3) erfolgen, die beide Stränge eines synthetischen Linkers repräsentierten. Dieser enthielt intern die beiden Bstx I Schnittstellen und bildete an den äußeren Enden einen Eco RI sowie einen Hind III Adapter, über die er problemlos in das mit diesen Enzymen geöffnete pUC-Plasmid inseriert werden konnte.

In diesen neuen Vektor pBstx wird das Ad2 Bstx I C Fragment einkloniert, das neue Plasmid soll pABC heißen. Es enthält zwei singuläre Schnittstellen, Hpa I und Kpn I, die sich ebenfalls im Plasmid pJM 1 Eco finden und dort die Mutation umschließen. Sie sollen dazu verwendet werden, den entsprechenden Bereich von pABC gegen die mutierte Sequenz aus pJM 1 Eco auszutauschen, und so die neue Eco RI Schnittstelle in das Ad2 Bstx I C Fragment einzuführen. Das mutierte Fragment wäre dann in einem Plasmid mit der Bezeichnung pABCE enthalten.

Aus pABCE kann anschließend das Ad2 Bstx I Fragment isoliert werden und zusammen mit den übrigen Ad2 Bstx I Fragmenten in einem Ligaseansatz vereinigt werden. Die religierte DNA sollte dann auf die Mutation hin untersucht werden und in einem Transfektionsexperiment in HeLa-Zellen vermehrt werden.

Der genaue Ablauf ist in der Übersicht Abb. 4.20. zusammengefaßt:

Strategie zur Rekonstitution von Ad2-DNA aus den Bstx I Fragmenten

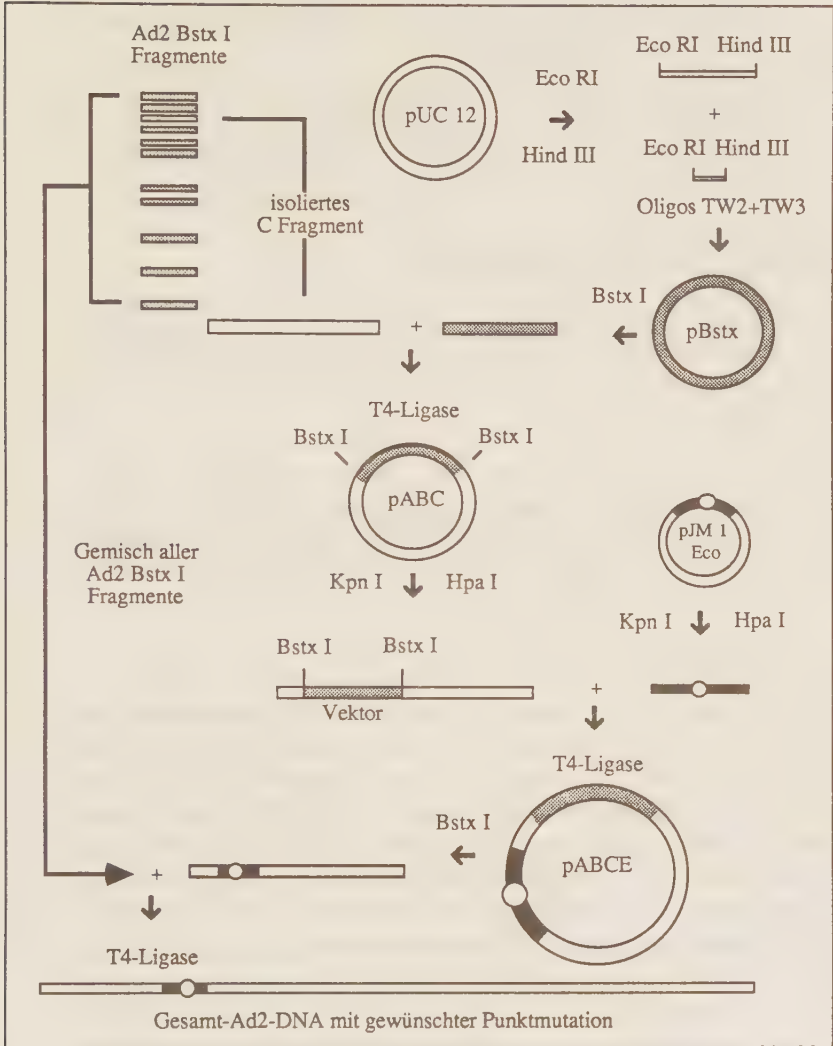


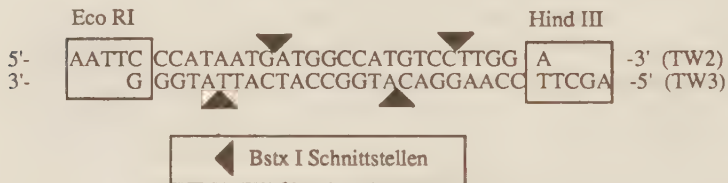
Abb.4.20.

Bstx I liefert ein klares Schnittmuster und die Fragmente können binnen zwei bis drei Tagen nahezu quantitativ wieder zu genomischer Größe von Ad2-DNA religiert werden (Abb. 4.22., Spuren 2,3 und 4).

Diese ligierte DNA kann mit Bam HI geschnitten werden, wobei sich eindeutig das für authentische Ad2-DNA erwartete Bandenmuster ergibt (Abb. 4.22., 9 und 10). Das kann als deutlicher Hinweis auf den korrekten Zusammenbau der Fragmente gewertet werden.

4.6.2. Konstruktion des Vektors pBstx aus pUC 12

Zunächst wurde der neue Linker in Form zweier Oligonukleotide auf dem DNA-Synthesizer hergestellt. Die beiden Rohprodukte wurden einzeln nach 3.11.2. gereinigt und 5'-phosphoryliert. Sie erhielten die Bezeichnungen TW2 und TW3. Ihre Sequenzen im Einzelnen:



Das Plasmid pUC 12 wurde mit den Enzymen Eco RI und Hind III gespalten und die Reaktionsprodukte nach 3.10.3. dephosphoryliert. Davon wurden 50 ng zusammen mit je einem pmol der beiden Oligonukleotide TW2 und TW3 in 20 µl Gesamtvolumen (Ligase-Puffer ohne Ligase und ohne ATP) für fünf Minuten bei 50° C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu dem Ansatz wurde 0,1 µl 10 mmol/l ATP sowie 5 u T4-DNA-Ligase gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 16° C über Nacht.

Am nächsten Tag erfolgte die Transformation von kompetenten E. coli HB101 Zellen, wobei der halbe Ligaseansatz (10 µl) auf 100 µl kompetente Zellen verwendet wurde.

Die resultierenden Klone wurden mittels Schnellausschluß auf Bstx I Schnittstellen untersucht und ein positiver Klon zur Plasmidgewinnung aufgezogen. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pBstx.

4.6.3. Klonierung des Ad2 Bstx I C Fragmentes und Einbau der Mutation aus pJM 1 Eco

Der Vektor pBstx wurde mit Bstx I geschnitten und dephosphoryliert. 10 µg Ad2-DNA wurden in 50 µl Gesamtvolumen mit 50 u Bstx I über Nacht bei 37° C inkubiert. Das Ad2 Bstx I C Fragment wurde aus dem Gemisch der Bstx I Fragmente durch die Membranfiltermethode von Weinberg and Hammerskjöld (1980, siehe 3.14.6.) isoliert.

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden ca. 100 ng des Fragmentes zusammen mit ca. 50 ng des Vektors 16 Stunden bei 16° C mit 5 u T4-DNA-Ligase inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Transformation auf kompetente E. coli HB101 Zellen. Die resultierenden Klone wurden wiederum durch Schnellaufschluß überprüft und ein positiver Klon zur Plasmidgewinnung aufgezogen. Das neue Plasmid erhielt die Bezeichnung pABC.

Um die Mutation von pJM 1 Eco in das Plasmid pABC zu übertragen, wurden beide Plasmide mit den Enzymen Hpa I und Kpn I gespalten. Die entstandenen Fragmente wurde auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und daraus zwei Fragmente nach der Filtermethode (3.14.6.) isoliert: Einmal das große Fragment aus pABC und zum Anderen das kleine Fragment aus pJM 1 Eco, das die neue Eco RI Schnittstelle enthält.

Das pABC Fragment wurde anschließend dephosphoryliert. Je 50 ng von beiden Fragmenten wurden in 20 µl Gesamtvolumen mit 5 u T4-DNA Ligase 16 Stunden ligiert und am nächsten Tag wieder eine Transformation auf kompetente E. coli HB101 Zellen durchgeführt.

Die entstandenen Klone wurden zunächst durch Koloniehybridisierung nach Wallace (siehe 3.12.6.) überprüft. Es fanden sich nur positive Klone. Für eine Auswahl wurde das Ergebnis der Hybridisierung dann noch durch Schnellaufschluß bestätigt, ehe wieder ein Klon zur Plasmidgewinnung aufgezogen wurde. Das neue Plasmid erhielt den Namen pABCE und enthält die Mutation aus pJM 1 Eco.

Abb. 4.21 zeigt die Plasmide mit ihren wichtigsten Restriktionsstellen:

Restriktions-Karten der Plasmide pJM 1 Eco, pABC und pABCE

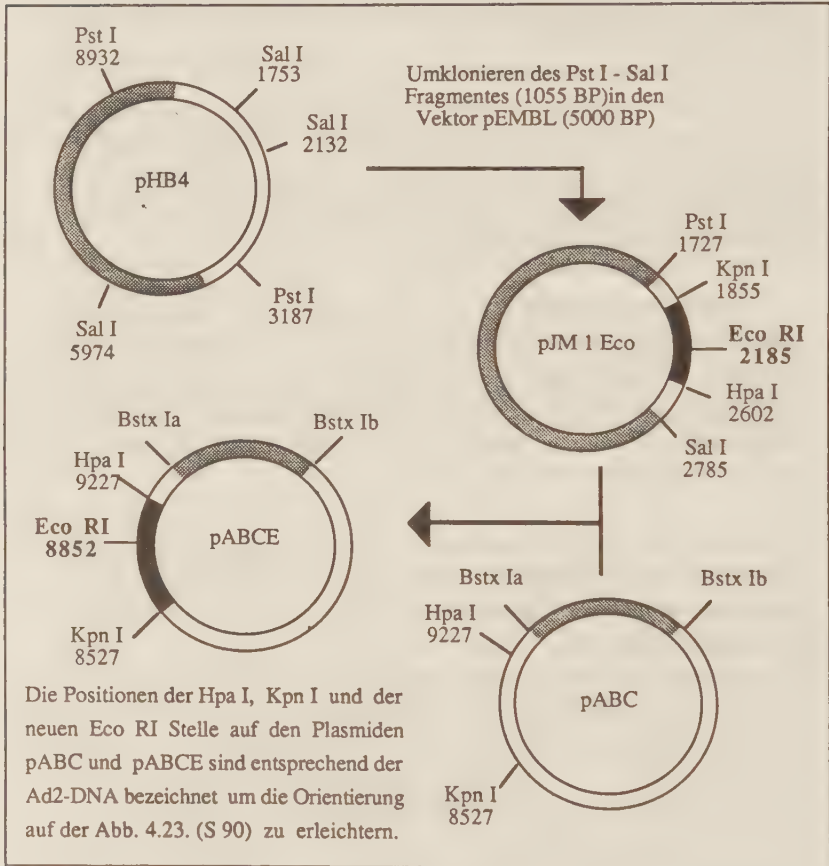


Abb. 4.21.

4.6.4. Rekonstitution von Gesamt Ad2-DNA mit dem Ad2 Bstx I Fragment aus pABCE

Das Plasmid pABCE (10 µg) wurde mit Bstx I über Nacht gespalten und das Ad2 Bstx I C Fragment aus dem Plasmid pABCE, das eine Eco RI Stelle trägt (Abb. 4.21.) über ein 1% Agarosegel abgetrennt und nach 3.14.6. isoliert.

Parallel wurden 10 µg Gesamt-Ad2-DNA ebenfalls über Nacht mit Bstx I gespalten. Anschließend erfolgte eine Phenolisierung und Extraktion. In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden das Fragmentgemisch von Ad2-DNA (10 µg) zusammen mit dem isolierten Fragment aus pABCE (5 µg) mit 10 u T4-DNA Ligase für 3 Tage bei 16° C inkubiert.

4.6.5. Charakterisierung der aus den Bstx I Fragmenten erzeugten mutierten Ad2-DNA

Zur Analyse der Produkte wurde ein Aliquot des ligierten Materials durch folgende Versuche analysiert: Zuerst wurde eine Verdauung mit den Enzymen Eco RI sowie Bam HI in getrennten Ansätzen durchgeführt. Das Agarosegel (1%) wurde anschließend nach Southern (siehe 3.11.3.) geblottet und das Filter mit dem Oligonukleotid TW1 hybridisiert, wie unter 3.12.6. beschrieben.

Das Restriktionsmuster, das mit den Enzymen Bam HI und Eco RI entsteht, sowie die Banden, die sich aus der direkten Auftrennung der Ligaseansätze ergeben, lassen eine detaillierte Zuordnung sehr vieler Banden zu. (Abb. 4.22.)

Für die Größenbestimmung der einzelnen Fragmente lassen sich die Spuren 4 (Ad2-DNA mit Bstx I geschnitten), 6 (Ad2-DNA mit Eco RI geschnitten) und die Spur 9 (Ad2-DNA mit Bam HI geschnitten) heranziehen, da für diese Spaltungen die genauen Größen der Fragmente aus der Sequenz von Ad2-DNA bekannt sind. Dadurch stehen Größenmarker im Bereich von 14 331 (Bam HI A Fragment) bis 2218 Basenpaaren (Eco RI F Fragment) zur Verfügung. Das 21 338 Basenpaare große Eco RI Fragment kann nicht als Größenmarker verwendet werden, da in diesem Bereich die Auflösung des Gels zu gering ist, um eindeutige Rückschlüsse auf die Größe zuzulassen.

Reassoziation von Ad2 Bstx I Fragmenten mit der Mutante pABCE

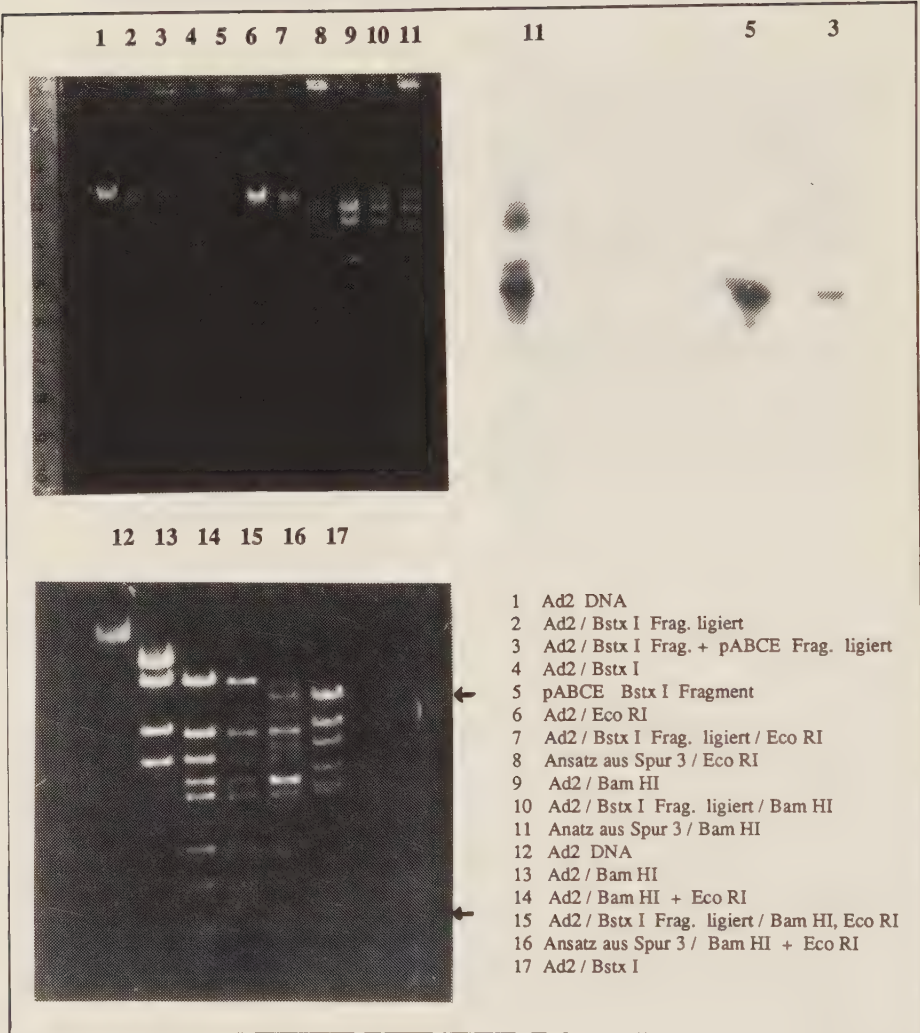


Abb. 4.22.

Zunächst zeigt sich ein charakteristisches Muster in den beiden Ligaseansätzen (Spuren 2 und 3). Unter der gut ausgebildeten Bande, die Gesamt-Ad2-DNA entspricht, sind noch drei prominente Banden sichtbar. Größenmäßig entsprechen sie folgenden Ligase-Zwischenprodukten (Von oben nach unten):

Die größte Bande ist >12 000 Nukleotide lang und entspricht damit der Summe der benachbarten Bstx I Fragmente H,G,E,K und B (tatsächliche Größe 13366 BP). Die nächste Bande läßt sich zu ca. 9200 BP Größe bestimmen und entspricht dem Dimer aus den Fragmenten C und D (tatsächliche Größe 9512, diese Annahme wird durch das Ergebnis des Blots erhärtet, siehe dort). Unter dem Dimer findet sich auch erwartungsgemäß ein dem Bstx I A Fragment entsprechendes DNA-Stück, womit die Relation zu den beiden anderen Teilstücken gewahrt bleibt. Das rechte Ende, bestehend aus den Fragmenten I,J und F ist nicht gesondert sichtbar, was an der zu schwachen Intensität der Banden liegen kann. Im Falle des Ligaseansatzes mit dem mutierten C Fragment aus pABCE (Spur 3) erkennt man noch deutlich das überschüssige Fragment.

Die Spuren 7 und 8 lassen sich nicht vollständig zuordnen. Es ist jedoch möglich, zumindest die erwarteten Fragmente aufzufinden. Spur 7 zeigt, abgesehen von einer zusätzlichen Bande unter dem Eco RI A Fragment, exakt das reguläre Eco RI Muster von Ad2-DNA. In Spur 8 kann der oberste Bereich nicht eindeutig identifiziert werden, es ist aber unverkennbar, daß das Eco RI A Fragment zu einem erheblichen Anteil gespalten wurde. Die beiden Teilfragmente, die sich zu 12486 und 8852 errechnen sind beide erkennbar. Darüber hinaus findet sich das im Ligaseansatz gegen die mutierte Form ausgetauschte Wildtyp-Bstx I C Fragment, das gegen Eco RI resistent ist. Die beiden Teilfragmente, die aus dem überschüssigen Bstx I C Fragment von pABCE entstehen, 4252 und 999 BP groß, sind ebenfalls zu sehen (das kleine Fragment nur schwach). Ansonsten zeigen sich die Fragmente Eco RI B bis F in unveränderter Größe, analog dem Wildtyp.

In den Spuren 10 und 11 läßt sich das Bam HI Muster des Wildtyps ebenfalls leicht nachweisen, wie es zum Vergleich in Spur 9 zu sehen ist. Das stellt eine zusätzliche Kontrolle neben dem Eco RI Muster dar, da das Zustandekommen eines regulären Bam H I Musters nur durch die richtige Kombination aller Bstx I Fragmente möglich wird. (Wie aus der Restriktionskarte (Abb. 4.23.) ersichtlich ist, überlappen die beiden Enzyme Bam HI und Bstx I sehr stark).

Restriktionsschnittstellen auf Ad2-DNA

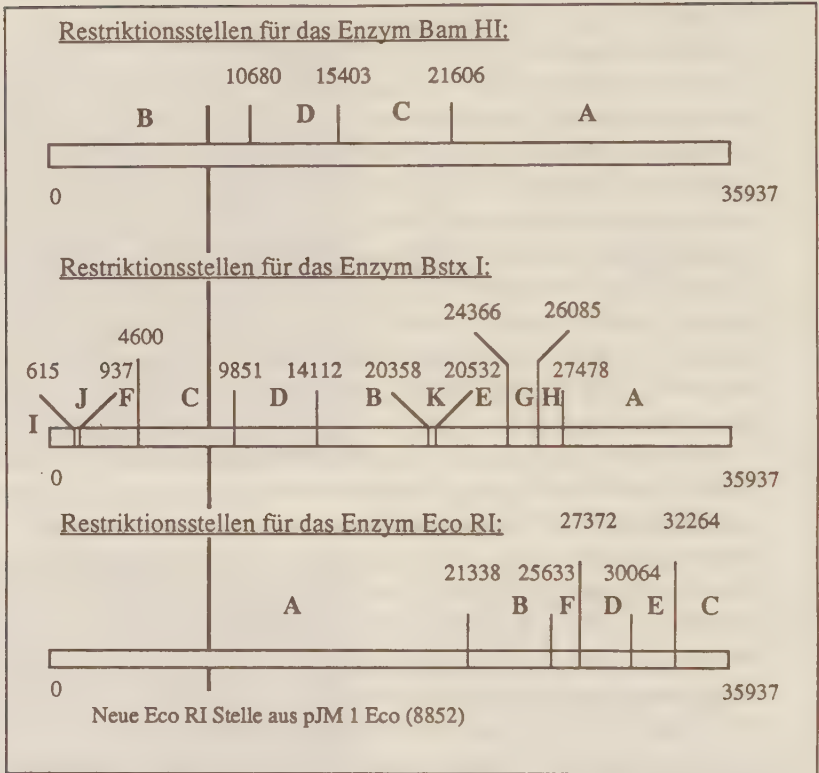


Abb. 4.23.

Der Doppelverdau mit Eco RI und Bam HI erweist zweifelsfrei, daß das Bam HI B Fragment der Mutante sich zu mehr als 50% mit Eco RI spalten läßt, woraus eine ebenso hohe Ausbeute an mutierter Ad2-DNA folgt. Dabei können wieder die erwarteten Teilfragmente (8772 und 1828 BP) an den entsprechenden Positionen des Gels gefunden werden (Spur 16, durch Pfeile markiert).

In gutem Einklang mit diesen Ergebnissen steht der Southernblot, der mit dem Oligonukleotid TW1 hybridisiert wurde. Nachdem der Filter stringent bei 54° C

gewaschen wurde, zeigen sich folgende Banden markiert (Abb. 4.22. linker Teil):

Das Bam HI B Fragment zeigt, wie erwartet, ein starkes Signal. Unter diesem findet sich eine weitere hybridisierende Bande, die aus dem Dimer Bstx I C + Bstx I D Fragment, einem Zwischenprodukt der Ligase, resultiert. Es ist ebenfalls in Spur 3 des Ligaseansatzes zu sehen und die Größenverschiebung zu Spur 11 korreliert gut mit der für die Bam HI Spaltung erwarteten Verkürzung. Es befindet sich zwar in unmittelbarer Nachbarschaft des Bam H I C Fragmentes, läßt sich aber durch den Eco RI, Bam HI Doppelverdau eindeutig von diesem abgrenzen. Daneben sieht man noch das unveränderte Bstx I C Fragment aus pABCE in den Spuren 3, 5 und 11. Spur 7 zeigt kein Signal, da hier das Bstx I C Fragment aus pABCE durch die Spaltung mit Eco RI zerstört wurde.

4.6.6. Transfektion von HeLa-Zellen mit der Ad2-DNA Mutante

Die Transfektion wurde entsprechend 3.5. mit den oben beschriebenen Ligaseansätzen durchgeführt. Als Kontrolle diente wiederum authentische Ad2-DNA, wie sie für die Bstx I Spaltungen eingesetzt wurde.

Zur Kontrolle der Transfektionsbedingungen wurde das Plasmid pmycCAT.P(a) in jeweils einem Ansatz mittransfiziert, und die CAT-Aktivität nach 3.9. gemessen.

Nach der Transfektion wurden die Petrischalen vier Tage bei 37 °C im CO₂-Inkubator belassen und dann zusammen mit den Zellen einer konfluent gewachsenen Falcon-Flasche (200 ml) auf große Petrischalen (20 x 20 cm) umgesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und nach 3.2.1. Virus präpariert.

Dabei zeigte sich, daß in vielen Fällen zwar die Kontrolle (ligierte Ad2 Bstx I Fragmente ohne pABCE-Fragment) zur Infektion führte, aber kein Virus aus den mutierten Ligaseansätzen resultierte.

Schließlich konnte eine sehr geringe Virusmenge aus einem Ligase-Ansatz mit dem Fragment aus pABCE erhalten werden, die isoliert, einmal auf einem 20 x 20 cm großen Monolayer mit HeLa-Zellen amplifiziert, und dann nach 3.3.2. zu Ad2-DNA aufgearbeitet wurde.

Zur Analyse der DNA wurden folgende Restriktionsanalysen durchgeführt: Spaltung mit dem Enzym Bam HI, sowie Doppelverdau mit den Enzymen Bam HI und Eco RI. Anschließend wurde das Agarosegel mit der Bam H I Spaltung nach Southern geblottet und das Filter mit dem Oligonukleotid TW 1 hybridisiert (TW 1

trägt die Mutationsstelle). Dabei fanden sich sowohl in der Restriktionsverdauung, als auch auf dem Filter keine Hinweise auf die Mutation. Der Anteil an mutierter DNA lag damit unterhalb der Nachweisgrenze des Southernblots. Da die zur Transfektion eingesetzte DNA zu mehr als 50 Prozent die mutierte Form enthielt (siehe Abb. 4.22.), fand offensichtlich eine Selektion gegen die Mutante statt, die sehr effizient verlief.

Um dieses Phänomen noch näher zu klären wurde die Mutante auf der Ebene des Plasmides PABCE nach Chen and Seeburg (1985) sequenziert.

4.7. Sequenzierung der Mutation in PABCE

Da die Mutation ca. 1000 Basen vom Ende des Inserts entfernt ist, konnte nicht mit dem Universalprimer für pUC-Plasmide sequenziert werden. Daher wurde ein spezieller Primer verwendet, der dicht neben der Mutationsstelle an die DNA bindet.

Sequenz und Orientierung des Primers TW 4

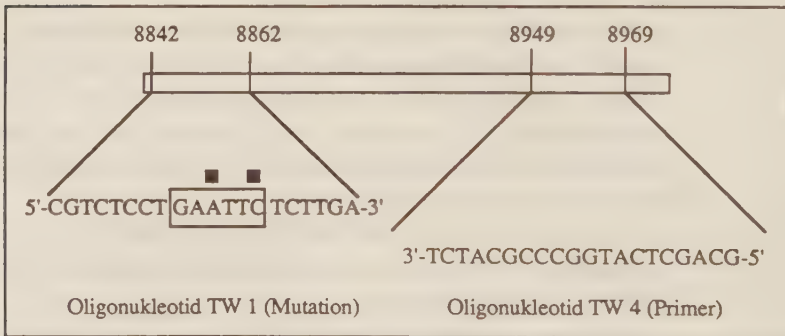


Abb. 4.25.

Zunächst wurde mit dem vorhandenen Oligonukleotid TW1, ausgehend von der neuen Eco RI Stelle, sequenziert. Daraus bestätigte sich die Sequenz des neuen Primers, die aus der Ad2-DNA Sequenz abgeleitet worden war. Die Lage dieser Sequenz und der Mutation ist in der Abb. 4.25. eingezeichnet. Ausgehend von diesem Primer wurde die Sequenz der Mutante bestimmt.

Sequenzvergleich zwischen Ad2-Wildtyp und Mutante aus pABCE

Obere Sequenz Wildtyp Ad2-DNA (unterstrichen), untere Sequenz Mutante pABCE, unter der Mutante ist der invertierte Bereich des Wildtyps in der der Mutante entsprechenden Orientierung angegeben, um die Übereinstimmung zu verdeutlichen.

9030

|
 5' - ATGCCGAAGGGGGGCGTGGTCTACAGCCGCGTCTGGAACGAGGGAGGC
TGCCGAAGGGGGGCGTGGTCTACAGCCGCGTCTGGAACGAGGGAGGC
CTCAACGCCTTCTCGCAGCTCATGGCCCGCATCTCCAACG^{GACCTCGCCG}
CTCAACGCCTTCTCGCAGCTCATGGCCCGCATCTCCAACG

25 Basenpaare deletiert

CCACCGTGGAGCGAGCCGGACGCGGAGATCTCC^{CCGGACGCGGAGA}
CCGGACGCGGAGATCTCCTGAGTTGTCTTGA
 TGAGTTGTCTTGA

TCTCCAGGAGGAAGAGATCGAGCAGTTCATGGCCGAAATCGCCTATCAAG
 TAGGCGATTTCGGCCATGAACTGCTCGATCTCTTCCTCCTGGAGATCTCC
 TAGGCGATTTCGGCCATGAACTGCTCGATCTCTTCCTCCTGGAGATCTCC

Eco RI-Stelle

241 Basenpaare deletiert

ACAACTCA^{CCGAAATCGCCTATCAAGA}CAA^{CTCAGGAGACG} ||
 GCGTCCGGCCGAAATCGCCTATCAAGAGAATTC^{AGGAGACG} AC
 GCGTCCGG aus pABCE

8560

|
GGGGGCCCCGCGCGTCACCGCTTTT AGATGCATCATCCAA - 3'
 GGGGGCCCCG_ACCG_GC_CACCGCTTTTAGATGCATCATCCAA

Die exakten Endpunkte der Inversion lassen sich nicht erkennen, da am 3'-Ende sowohl die Inversion als auch die Wildtypsequenz das Tetranukleotid CCGG aufweisen. Für eine mechanistische Begründung der Inversion ist dieser Bereich sicherlich zu kurz, weshalb es vertretbar erscheint, das Teranukleotid in die Inversion einzubeziehen. Dafür spricht auch die Tatsache, daß dann die Duplikation der Sequenz sowohl am Rande der Inversion (5' in obiger Darstellung) als auch innerhalb der Inversion identisch werden.

Es finden sich noch weitere kurze übereinstimmende Bereiche, beispielsweise das Pentanukleotid TCTCC, das sich zu Beginn der Inversion zweifach in kurzem Abstand findet und zu dem eine Gegensequenz GGAGA exakt am Ende der Inversion (Duplikation 3') vorhanden ist (in 5' -> 3'-Richtung gesehen).

Der mutierte Bereich wird auf beiden Seiten von Wildtypsequenzen umschlossen, außerdem befindet sich die Kpn I Stelle (8527) dicht benachbart dem einen Ende der Sequenz (8560). Man kann also davon ausgehen, daß die vorliegende Sequenz die Mutante pABCE vollständig beschreibt.

Unter Berücksichtigung der gravierenden Veränderungen, die die Mutante pABCE aufweist, ist es verständlich, warum es nicht gelang sie *in vivo* zu isolieren. Es bietet sich auch eine Erklärung für das beobachtete Interferenzphänomen an, das die Infektion durch die im Ligaseansatz vorhandene Wildtyp-DNA verhinderte.

5. Diskussion

5.1. Der Ap_4A -Effekt auf die Adenovirus-DNA-Replikation

Durch zahlreiche Versuche konnte ein reproduzierbarer Basis-Effekt für die Stimulation der [^3H]-dTTP-Inkorporation etabliert werden. Er lag aber weit unter der Steigerungsrate, die in früheren Einzelversuchen erzielt wurden (bis Faktor 6) und die den Anstoß zu genaueren Untersuchungen gegeben hatten.

Da die regulatorischen Mechanismen, die den intrazellulären Ap_4A -Spiegel kontrollieren, noch immer ungeklärt sind, stellte das endogen vorhandene Ap_4A einen erheblichen Störfaktor für die Versuche dar, der die Reproduzierbarkeit negativ beeinflusste. Wurde Ap_4A in einer Konzentration eingesetzt, wie sie in den Zellen normalerweise vorliegt (maximal 1 - 10 $\mu\text{mol/l}$, Weinmann-Dorsch, et al. 1984), so ergaben sich niemals Unterschiede zu den Kontrollen. Erst die verwendete Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ führte zu meßbaren Veränderungen der Kinetik.

Offenbar muß der interne Ap_4A -Spiegel deutlich überlagert werden, ehe sich der Effekt des exogen zugesetzten Ap_4A manifestieren kann. Um dieses Problem wenigstens teilweise zu umgehen, ist es erforderlich, die endogene Ap_4A -Konzentration zu senken. Da man keinen direkten Einfluß auf dessen Regulation nehmen kann, manipuliert man die intakten Zellen.

Die interne Ap_4A -Konzentration in HeLa-Zellen kann durch eine Interferonbehandlung um ca. eine Größenordnung abgesenkt werden (Weinmann-Dorsch et al., 1984). Aufgrund des antiviralen Effektes von Interferon, ist es nicht für Untersuchungen mit Adenovirus geeignet. Man kann die Ap_4A -Konzentration aber auch auf eine andere Weise beeinflussen.

Sie ist in langsam wachsenden Zellen geringer als bei schneller Proliferation (Weinmann-Dorsch et al., 1984). Daher wurden durch Reduktion des Serumanteils am Medium die Zellzykluszeiten verlängert. Da sich dieser Effekt als vollständig reversibel erwies, erzeugt das Verfahren keine permanenten Schäden in den Zellen.

Die Gesamtsynthese in isolierten Zellkernen aus serumgehungerten Zellen war

zwar gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht, die Relation zwischen Kontrolle und Ap₄A-Ansatz blieb aber nahezu erhalten. Ähnliches gilt für den Einsatz von Proteinbiosynthese-Inhibitoren, die ebenfalls keine Veränderung des Stimulations-effektes bewirkten.

Aus den Arbeiten von Bochner et al. (1984) geht hervor, daß die Ap₄A-Konzentration durch die verfügbare Sauerstoffkonzentration beeinflusst wird. Daher kann sich der interne Ap₄A-Spiegel während der Kernisolation entsprechend verschieben, da nach dem Aufbrechen der Zellen sicherlich ein Sauerstoffschock erfolgt.

Aussagen, die über die prinzipielle Bestätigung eines Basiseffektes hinausgehen, erfordern aus diesen Gründen ein besser kontrollierbares System, als die derzeitigen *in vitro* Verfahren.

Die Versuche mit ³H-markiertem Ap₄A zeigten deutlich, daß die Adenovirus-infektion die Stabilität des exogenen Ap₄A beeinflussen kann. Die infizierten HeLa-Zellkerne zeigten eine starke Ap₄Ase-Aktivität, die in den nicht infizierten Zellkernen fehlt. Das dürfte in engem Zusammenhang mit der Inkorporation von ³H-Aktivität aus Ap₄A in die virale DNA stehen, der in infizierten Zellkernen stattfindet. Im Gegensatz dazu bauen nicht infizierte HeLa-Zellkerne keine Aktivität aus Ap₄A in säurefällbares Material ein, obwohl die zelluläre Reparatursynthese sehr aktiv ist.

Der Einbau des Ap₄A oder seiner Spaltprodukte ließe sich eventuell in Analogie zu den Arbeiten von Zamecnik et al. (1982) erklären. Falls Ap₄A in der Adenovirus-DNA-Replikation ebenfalls eine begrenzte Primerfunktion übernehmen würde, wäre das eine attraktive Erklärung für die Steigerung der Kinetik. Wie der transiente Stimulationseffekt zeigt, stellt das bestenfalls eine Ergänzung der normalen Initiation, aber keine vollwertige Alternative dar.

Der Ap₄A-Einbau könnte ebenfalls mit der Reparatursynthese zusammenhängen, da diese in dem verwendeten *in vitro* System prinzipiell nicht von der Elongationsreaktion unterschieden werden kann. Wie von Reiter (1980b) gezeigt wurde, kommt es unter den angewandten Bedingungen zu einer starken Elongation, weshalb ein Mitwirken des Ap₄A daran durchaus möglich wäre.

Die Versuche mit Phosphodiesterase unterliegen der prinzipiellen Einschränkung, daß das Enzym zwar präferentiell Ap₄A spaltet, aber auch alle anderen Phosphodiesterbindungen attackiert. Wie die stark reduzierte Syntheserate zeigt,

wird das gesamte System in Mitleidenschaft gezogen. Der Effekt von Ap_4A äußert sich in diesen Versuchen auch eher in einer Stabilisierung, denn in einer Stimulation der Kinetik. Zumindest im ersten Punkt der Kinetik findet man noch eine den Kontrollen vergleichbare Einbaurrate, weshalb sich ein Stimulationseffekt zeigen sollte, falls eine initiale Gabe an Ap_4A genügt. Das System ist noch nicht durch die Phosphodieseterase erkennbar geschädigt. Da sich trotzdem kein Effekt zeigt, scheint die dauernde Präsenz einer Mindestkonzentration an Ap_4A erforderlich zu sein, Ap_4A wirkt also nicht nur als "Initialzündler". Das steht auch im Einklang mit dem gefundenen realen Einbau in die wachsende oder reparierte DNA.

Das Dinukleotid Ap_4A beeinflusst nicht nur Adenovirusinfektionen. Sein selektiver inhibitorischer Effekt auf das virale $\text{pp60}^{\text{v-src}}$ scheint von der Zelle aktiv genutzt zu werden. Als Folge einer Rous-Sarcom-Virus Infektion steigt der intrazelluläre Ap_4A -Spiegel an (Barnekow, pers. Mitteilung). Das läßt einen kausalen Zusammenhang möglich erscheinen. Anhand dieses Phänomens böte sich eventuell ein Ansatzpunkt, um die Regulation von Ap_4A in der Zelle zu untersuchen.

Um die Rolle des Ap_4A , auch in Bezug auf die Adenovirus-DNA-Replikation, näher aufklären zu können, wird es unumgänglich sein, ein vollständig *in vitro* aus gereinigten Komponenten aufgebautes System zu verwenden. Ehe ein solches zur Verfügung steht, ist es wahrscheinlich nicht möglich, zu detaillierteren Aussagen zu kommen. Der beobachtbare Stimulationseffekt ist vermutlich nur eine sekundäre Folge der Einwirkung von Ap_4A . Der primäre Effekt wird mehr im Mechanismus der Inkorporation und Degradation des Dinukleotids zu suchen sein.

5.2. Rekonstitution des Adenovirusgenoms aus Restriktionsfragmenten

Die fortschreitende Perfektion der Klonierungstechniken, sowie die steigenden Ansprüche an die Komplexität der zu klonierenden Gene hat dazu geführt, daß man gezwungen ist, immer größere Vektorkonstruktionen einzusetzen. Speziell auf dem Gebiet der eukaryontischen Vektoren haben sich Virusgenome durchgesetzt, da sie für eine effiziente Expression klonierter Gene sorgen.

Neben den vergleichsweise kleinen Genomen der Retroviren gewinnen auch zunehmend größere Viren wie Adenovirus an Bedeutung (Mansour et al., 1985, Saito et al, 1985, Yamada et al, 1985). Bedingt durch die Größe des Genoms, sind

hier mehr oder weniger große Umwege erforderlich, um spezifische Mutationen in bestimmte Positionen der viralen DNA zu bringen. Entweder man bediente sich spezieller Restriktionsmutanten, die günstige Konstellationen aufweisen (Yamada et al, 1985, Hanahan and Gluzman, 1984), und so die Klonierungen erleichtern, oder man war auf die Mithilfe der Rekombination mit dem Wildtyp angewiesen (Mansour et al., 1985). Speziell das letztere Verfahren erfordert unbedingt einen selektionierbaren Marker, um die gewünschte Rekombinante isolieren zu können.

Das gestiegene Interesse an der *in vitro* Mutagenese und an der Manipulation größerer Genome kommt besonders in zwei Übersichtsartikeln aus jüngster Zeit zur Geltung (Botstein and Shortle, 1985, Roizman and Jenkins, 1985). Auch dort wird vorwiegend auf Rekombination zurückgegriffen, um größere Genome zu verändern.

Falls man über ein System verfügt, das es erlaubt, Restriktionsfragmente direkt wieder zusammenzufügen, ohne daß deren Reihenfolge dabei permutiert wird, so kann man damit alle bisherigen Verfahren der *in vitro* Mutagenese für kleine DNA-Moleküle, wie bakterielle Plasmide, ohne Umweg auf Gesamt-Adenovirus DNA oder ein ähnlich großes Genom übertragen. Um diese Theorie in der Praxis überprüfen zu können, habe ich Restriktionsfragmente genomischer Adenovirus Typ 2 DNA verschiedener Typ III Restriktionsenzyme ligiert und dann charakterisiert.

Die anfänglichen Ansätze mit den Enzymen Hga I und Fok I erbrachten nicht das erwartete Ergebnis nach der Ligasebehandlung: intakte Ad2-DNA genomischer Größe in möglichst quantitativer Ausbeute. Die Analysen der Produkte in Sucrose-Gradienten zeigten zwar, daß die Größenselektion nach oben funktionierte, es entstanden keine Moleküle über Genomgröße, doch erreichte nur ein kleiner Teil Genomgröße, während das meiste darunter blieb.

Trotzdem war es möglich mit dieser Mischung erfolgreich HeLa-Zellen zu transfizieren und daraus Vrus zu erhalten. Durch diese biologische Selektion wird aber der größte Teil der ligierten Moleküle wieder verworfen, wodurch die Effizienz des Verfahrens stark abnimmt. Außerdem erwies sich, daß während der Ligasereaktion auch nur äußerst wenig mutierte DNA mit ausreichender Größe erzeugt wird.

Wie sich aus den Computeranalysen ergab, liegt der Grund dafür in der Erzeugung mehrerer identischer Fragmentenden durch die genannten Restriktionsenzyme. Die Versuche haben eindeutig gezeigt, daß Enzyme, die nicht nur singuläre Schnittstellen erzeugen, ungeeignet sind. Als singulär bezeichne ich Schnittstellen,

deren überstehende Nukleotidsequenz nur an einem einzigen Restriktionsfragment dieses Enzyms vorkommt. Alle anderen Fragmente, die aus einer bestimmten DNA entstehen, weisen einzelsträngige Endsequenzen auf, die von jeder anderen Endsequenz verschieden sind.

Um dies sicherzustellen, ist die exakte Kenntnis der Sequenz der DNA nahezu zwingend erforderlich. Nur dann kann man die richtigen Enzyme auswählen. Umgekehrt muß ein Ligasemuster, wie es von Fok I oder Hga I Ad2 Fragmenten gebildet wird (keine definierten Banden, kontinuierliche Verteilung über den ganzen Bereich), als Beweis für die Untauglichkeit des Enzyms angesehen werden.

Aus den genannten Gründen schränkt sich die Auswahl der in Frage kommenden Enzyme natürlich erheblich ein und muß für jede DNA individuell bestimmt werden. Aus statistischen Überlegungen heraus (siehe S 61) kann man allerdings davon ausgehen, daß Enzyme, die mehr als 18 Fragmente erzeugen, kaum noch strikt singuläre Enden aufweisen, wenn sie ein überhängendes Tetranukleotid erzeugen.

Falls sich am Ende ein Pentanukleotid befindet, wird die Wahrscheinlichkeit, mindestens ein Paar identischer Endsequenzen zu finden, ab 37 Fragmente erreicht. Diese statistischen Daten sind mit großen Unsicherheiten behaftet, da sich die nicht statistische Verteilung der Basen erheblich auswirkt (Statistik kleiner Zahlen). Klarheit über die Eignung eines Enzyms und eventuelle Probleme kann nur die Sequenz der DNA bringen.

Verfügt man allerdings über ein geeignetes Enzym, wie das Bstx I im vorliegenden Fall, so ist es möglich die Restriktionsfragmente quantitativ zu Genomgröße zu religieren. Wie die Analysen der Ligaseansätze zeigten, werden die Fragmente ebenfalls quantitativ in der richtigen Orientierung verknüpft, was sich durch verschiedene überlappende Restriktionsmuster überprüfen läßt. Außerdem sind die so gewonnenen Moleküle biologisch aktiv, was als weiterer Hinweis auf die Korrektheit der Ligasereaktion anzusehen ist.

In diesem System ist es auch möglich ein mutiertes Fragment mit sehr hoher Ausbeute (> 50 Prozent) in das Genom einzubauen. Wieder zeigen die Restriktionsmuster und Hybridisierungs-Analysen, daß es zu keinem Fehleinbau kommt. Vor allem die Eco RI / Bam H I Doppelspaltung zeigt, wie spezifisch die Rekonstitution der Fragmente abläuft. Es entsteht exakt das Wildtyp-Restriktionsmuster, das sich nur in dem Bam H I B-Fragment vom Wildtyp unterscheidet:

Neben den beiden Spaltprodukten dieses Fragmentes tritt nur noch die zusätzliche Bande des überschüssigen Ad 2 Bstx I C Fragmentes auf. Das scharfe Restriktionsmuster zeigt deutlich den quantitativen und spezifischen Charakter der Ligasereaktion (Abb. 4.22.).

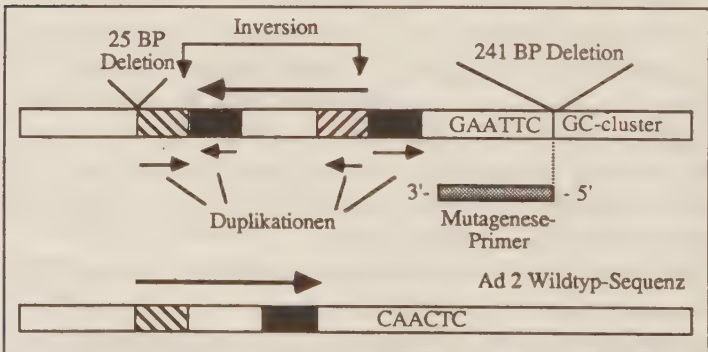
Um die eigentliche Mutagenese durchzuführen, habe ich das entsprechende Bstx I Fragment in einem speziell darauf zugeschnittenen pUC-Vektor subkloniert, und dann der Mutagenese nach Zoller und Smith (1982) unterworfen. Das im Einzelfall angewendete Verfahren spielt dabei keine Rolle, jedes für Plasmide entwickelte System ist einsetzbar.

Sequenz der Mutante pABCE

Wie aus den Sequenz-Daten hervorgeht, kam es neben der erwünschten Mutation noch zu weiteren Sequenzveränderungen, die zum Teil sicherlich in Besonderheiten der Adenovirussequenz an diesen Stellen zurückzuführen sind, zum anderen auch an der Methode liegen können.

Die Unterschiede zwischen der Ad 2 Wildtypsequenz und der in der Mutante pABCE gefundenen Sequenz sind in der Abb. 5.1. noch einmal zusammengestellt.

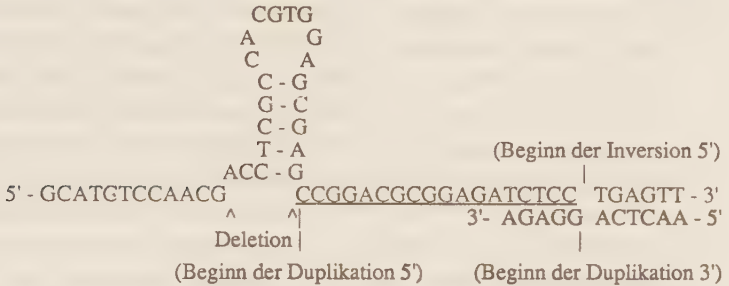
Übersicht über die Sequenz der Mutante pABCE



Die Inversion ist durch das Muster abgesetzt. Sie unterscheidet sich nur in der Orientierung vom Wildtyp.

Abb. 5.1.

Die 25 Basen(paare), die am linken Ende der in Abb. 5.1. eingezeichneten Inversion liegen, können als Einzelstrang folgende Sekundärstruktur annehmen:



Die Duplikation auf dieser Seite der Inversion umfaßt exakt die Basenpaare, die zwischen der Deletion und dem Beginn der Inversion liegen (unterstrichen). Bemerkenswert ist auch die Struktur der anderen Duplikation, die sich bis in den Bereich der neuen Eco RI Stelle erstreckt. Die Sequenzierung ergab eindeutig, daß der invertierte Bereich die Wildtypsequenz enthält, während man im Bereich der duplizierten Sequenz außerhalb der Inversion die neue Eco RI Stelle findet.

Die Duplikation dieses Abschnittes erfolgte also entweder auf der Stufe des Heteroduplex, der Wildtyp und Mutante in jeweils einem Strang enthielt, oder über eine Rekombination des mutierten Plasmids mit einem Wildtyp-Plasmid. Bedenkt man, daß pJM 1 Eco ursprünglich aus einem Klon isoliert wurde, der beide Plasmide zugleich enthielt, so kann man die zweite Möglichkeit nicht ausschließen.

Das Zustandekommen der Inversion, die Wildtypsequenzen in umgekehrter Orientierung, aber ohne jede Sequenz-Veränderung enthält, läßt sich allein aus den Sequenzdaten nicht ableiten. Es sind keine Haarnadelstrukturen ausreichender Länge feststellbar, die die gefundene Orientierung bewirken könnten. Die endständigen Duplikationen und die Konservierung der Sequenz lassen allerdings einen nicht zufälligen Ablauf vermuten. In der Darstellung der Haarnadelstruktur ist am linken Ende noch unmittelbar an der anderen Grenze der Inversion gelegene Bereich hinzugefügt. Die Homologie beschränkt sich zwar auf ein Pentanukleotid, doch ist die Tatsache bemerkenswert, daß der Beginn der Inversion (5') und der Anfang der duplizierten Sequenz am 3'-Ende exakt mit der gezeigten Grenze übereinstimmen.

Es würde zu weit führen, daraus einen Mechanismus abzuleiten, doch erscheint es nach den strukturellen Daten unwahrscheinlich, daß diese Übereinstimmungen rein zufälliger Natur sein sollten.

Für die große Deletion auf der anderen Seite des Mutagenese-Primers kann man ebenfalls keine exakte Erklärung in der Sequenz finden. Zwei Faktoren weisen allerdings auf eine Möglichkeit hin: Erstens ist die eine Grenze der Deletion exakt mit dem 5'-Ende des Oligonukleotids identisch und zweitens befindet sich der andere Endpunkt in einem ausgedehnten Gebiet mit sehr hohem GC-Gehalt. Tritt ein sehr hoher Anteil an GC auf, so hat die Klenowpolymerase Schwierigkeiten die Reaktion fortzusetzen (Mills and Kramer, 1979). Möglicherweise brach die Elongation des zweiten Stranges dort ab, und es verblieb eine Einzelstranglücke, die in der Zelle ausgeschnitten wurde. Das wäre plausibel, ist aber nicht beweisbar.

Unabhängig von ihrer Entstehung hat die Inversion dennoch bedeutende Konsequenzen. Sowohl der Promotorbereich als auch das 3'-Ende des Genes für den Vorläufer des terminalen Proteins wurden nicht verändert, da beide außerhalb der mutierten Region liegen. Daher kann man annehmen, daß die RNA gebildet wird. Ob sie auch zur Synthese des entsprechenden Proteins führt ist unklar.

In den Transfektionen wurde eine deutliche Interferenz der mutierten DNA mit dem Wildtyp gefunden. Sie verhinderte die Infektion durch die nicht mutierte ligierte DNA, die ohne Zugabe der Mutante erfolgreich verlief.

Das kann an einem Protein liegen, das das funktionelle terminale Protein verdrängt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die mutierte RNA mit der Wildtyp-RNA interferiert und so die Translation des Precursors selbst verhindert. Die Inversion stellt in einem Bereich von 71 Basenpaaren die RNA des Gegenstranges dar, also anti-sense-RNA. Diese könnte an die normale RNA hybridisieren, und so deren Translation verhindern; ein entsprechender Mechanismus wurde beschrieben (Travers, 1984, Kim et al, 1985).

Voraussetzungen für die Rekonstitution von Typ III Restriktionsfragmenten

Man könnte zwar durch einen Vorversuch anhand des resultierenden Ligasemusters ein geeignetes Enzym ohne die DNA Sequenz auswählen; spätestens für die Klonierung eines der Fragmente zur *in vitro* Mutagenese ist die Kenntnis der genauen End-Sequenz unumgänglich.

Der Grund dafür sind die singulären Fragmentenden. Daher gibt es weder einen allgemein verwendbaren Linker, noch läßt sich die Struktur vorhersagen. Sie kann nur aus der Sequenz der Schnittstelle ermittelt werden. Man muß sich für jedes Fragment einen speziellen Vektor konstruieren, aber dieser Mehraufwand fällt kaum ins Gewicht, da heute die erforderlichen Oligonukleotide relativ leicht zugänglich sind.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, gleich alle Fragmente zu klonieren, was im Fall von Adenovirus Typ 2 DNA die Konstruktion von elf Vektoren bedeuten würde. Als Ergebnis dieses Aufwandes könnte man dann aber an jeder Stelle des Genoms mutieren. Es spricht auch nichts dagegen, sich Kollektionen von verschiedenen mutierten Fragmenten anzulegen und diese dann je nach Bedarf mit den restlichen Wildtyp-Fragmenten (oder anderen Mutanten) zusammenzuligieren.

Wie die Ligase-Ansätze mit dem Fragment aus pABCE zeigen, ergeben sich keine Probleme, wenn man klonierte Fragmente in die Ligase einsetzt. Schließlich entfällt die Konkurrenzreaktion mit dem Wildtyp, wenn man kein Wildtyp-Fragmentgemisch mehr einsetzen muß. Damit sollte sich die gewünschte Mutante zu 100 Prozent *in vitro* erzeugen lassen.

In der eben geschilderten Weise läßt sich also jede geeignete DNA-Sequenz, für die es ein Typ III Restriktionsenzym gibt, das nur singuläre Fragmentenden erzeugt, in eine Kollektion von Klonen verwandeln. Diese repräsentieren die gesamte Sequenz ähnlich einer mini-Genbank, doch lassen sich die Inserts wieder zu einer funktionellen DNA zusammensetzen.

Es erscheint mir aus diesem Grund angebracht, dafür die Bezeichnung "Baukasten-System" zu wählen. Da sich in einen solchen Satz von Klonen sowohl Fragmente mit einem Selektionsmarker, als auch Polylinkersequenzen integrieren lassen, stellt dieses System auch ein wichtiges Hilfsmittel für die Vektorentwicklung dar.

Den oben ausgeführten Aspekten der Anwendung widerspricht das negative *in vivo* Ergebnis mit der Mutante pABCE in keiner Weise, da die Sequenzierung den Grund für diesen Misserfolg aufzeigte. Letale Mutationen, noch dazu wenn sie *in trans* mit dem Wildtyp interferieren, lassen sich natürlich mit keinem System *in vivo* isolieren.

Das Problem unerwünschter Nebeneffekte bei der *in vitro* Mutagenese kann in zukünftigen Versuchen auf verschiedene Weisen umgangen werden: Erstens sind mittlerweile entsprechend verbesserte Alternativ-Verfahren entwickelt worden, so daß man solche Schwierigkeiten zukünftig wohl umgehen kann (Carter et al, 1985, Kramer et al., 1984, Fritz et al, 1985 persönliche Mitteilung, Schold et al., 1984, Kunkel, 1985). und zweitens ist die Sequenzierung der erhaltenen Mutanten durch die vorwiegend 1985 etablierten Methoden der Doppelstrangsequenzierung (Chen and Seeburg 1985, Peter Heinrich, persönliche Mitteilung), stark vereinfacht worden.

Damit kann man jetzt unmittelbar nach der Mutagenese mit einem vertretbaren Aufwand die Sequenz der neuen Mutante bestimmen und ungeeignete Klone sofort aussondern. Durch diese neuen Möglichkeiten reduziert sich der erforderliche Zeitaufwand für die Anwendung des Verfahrens auf einen Bruchteil der Zeit, die seine Entwicklung und Etablierung erforderte.

Das zeigt meines Erachtens einen weiteren Vorteil dieses Systems auf: Man kann Verbesserungen und Weiterentwicklungen gentechnologischer Techniken unmittelbar in das System übernehmen, ohne prinzipiell etwas zu verändern.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Ap_4A auf die Replikation von Adenovirus Typ 2 DNA in isolierten Zellkernen untersucht und ein *in vitro* System für die Rekonstitution von Typ III Restriktionsfragmenten am Beispiel Adenovirus Typ 2 DNA entwickelt und getestet.

Es konnte ein stimulierender Effekt des Ap_4A auf die Ad2-DNA Replikation und die selektive kovalente Bindung von zumindest einer Adeninbase aus Ap_4A an Ad2-DNA in Ad2-infizierten HeLa-Zellkernen *in vitro* nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich in diesen Kernen eine ohne Infektion nicht auftretende Ap_4Ase -Aktivität.

Verschiedene Typ III Restriktionsenzyme wurden auf ihre Verwendbarkeit für das Rekonstitutions-System getestet und die erforderlichen Voraussetzungen exakt definiert. Mit dem Enzym Bstx I konnten die Restriktionsfragmente *in vitro* quantitativ zu biologisch aktiven Ad2-DNA Molekülen religiert werden.

Außerdem konnte ein zuvor in einem Subklon mutagenisiertes Bstx I Fragment aus Ad2-DNA selektiv und mit über 50 Prozent Ausbeute in Ad2-DNA genomischer Größe eingebracht werden. Die Mutante erwies sich *in vivo* als letal und interferierte mit dem Wildtyp-Helfervirus. Daher wurde die vollständige Sequenz der Mutation bestimmt. Sie beinhaltet eine Inversion im transkribierten Bereich, dessen Transkription einen Bereich von 71 Basen anti-sense RNA erzeugt. Daraus läßt sich eine Erklärung für die beobachtete Interferenz ableiten.

7. Literaturverzeichnis

Barnekow A. (1983)

Effect of several nucleotides on the phosphorylating activities of the Rous-sarcoma-virus transforming protein pp60^{v-src} and its cellular homologue, pp60^{c-src}:

Bioscience Reports 3, pp 153 - 162

Boehringer Mannheim (1973)

Biochemica Informationen I + II

Boehringer Mannheim, Eigenverlag

Bochner B. R., Lee P. C., Wilson S. W., Cutler C. W. and Ames B. N. (1984)

AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress:

Cell 37, pp 225 - 232

Botstein D. and Shortle D. (1985)

Strategies and application of *in vitro* mutagenesis:

Science 229, pp 1193 - 1201

BRL INC. (1980)

M13 Cloning/'Dideoxy' Sequencing Manual:

BRL INC. Gaithersburg, Maryland 20760

Carter P., Beduelle H. and Winter G. (1985)

Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors:

Nucleic Acid Res. 13, pp 4431-4443

- Challberg M. D., Desiderio S. V. and Kelly T. J. (1979)
Adenovirus replication *in vitro* :
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, pp 655 - 659
- Challberg M. D., Desiderio S. V. and Kelly T. J. (1980)
Adenovirus DNA replication *in vitro* : characterization of a protein covalently linked
to nascent DNA strands:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, pp 5105 - 5109
- Chen E. Y. and Seeburg P. H. (1985)
Supercoil Sequencing : A fast and simple method for sequencing plasmid DNA:
DNA 4, pp 165 - 170
- Chow K.-C. and Pearson G. D. (1985)
Adenovirus infection elevates levels of cellular topoisomerase I:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, pp 2247 - 2251
- Cohen S. N., Chang A. C. Y. and Hsu L. (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli*
by R-factor DNA:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, pp 2110 - 2114
- Dente L., Cesarini G. and Cortese R. (1983)
pEMBL: a new family of single-stranded plasmids:
Nucleic Acid Res. 11 pp 1645 - 1655
- Dulbecco R. and Freeman G. (1959)
Plaque production by polyoma virus:
Virology 8, pp 369-397
- Eagle H. (1959)
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures:
Science 130, pp 432-437

Engel A. (1973)

Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik Band I: Das Geburtstagsproblem
Ernst Klett Verlag Stuttgart, pp 50

Fütterer J. and Winnacker E.-L. (1984)

Adenovirus DNA replication:
Current Topics in Microbiology and Immunology 111, pp 41 - 64

Gorman C. M., Moffat L. F. and Howard B. H. (1982)

Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells:
Molecular and Cellular Biology 2, pp 1044 - 1051

Green, M., Pina M., Kimes R., Wensink, P.C., MacHattie L.A. and Thomas C.A.Jr.
(1967)

Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, pp 1302 - 1309

Grunstein M. and Hogness D.S. (1975)

Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, pp 3961 - 3965

Hanahan D. and Gluzman Y. (1984)

Rescue of functional replication origins from embedded configurations in a plasmid carrying the adenovirus genome:
Molecular and Cellular Biology 4, pp 302 - 309

Hay R. T. (1985)

The origin of adenovirus DNA replication: minimal DNA sequence requirement *in vivo* :
The EMBO Journal 4, pp 421-426

Hilleman M.R. and Werner J.H. (1954)

Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, pp 183 - 188

- Kessler C., Neumaier P. S. and Wolf W. (1985)
Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases - a review
Gene 33, pp 1 - 102
- Kim S. K. and Wold B. J. (1985)
Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA:
Cell 42, pp 129 - 138
- Kramer W., Drusta V., Jansen H.-W., Kramer B., Pflugfelder M. and Fritz H.-J. (1984)
The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction:
Nucl. Acid Res. 12, pp 9441 - 9455
- Kunkel T. A. (1985)
Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, pp 488 - 492
- Lally C., Dörper T., Gröger W., Antoine G. and Winnacker E.-L. (1984)
A size analysis of the adenovirus replicon:
The EMBO Journal 3, pp 333 - 337
- Langridge I., Langridge P. and Bergquist P. L. (1980)
Extraction of nucleic acids from agarose gels:
Analytical Biochemistry 103, pp 264 - 271
- Larson R. and Messing J. (1982)
Apple][software for M13 shotgun DNA sequencing:
Nucl. Acid Res. 10, pp 39 - 49
- Lechner R. L. and Kelly T.J. (1977)
The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules:
Cell 12, pp 1007 - 1020
- Maniatis T. Fritsch E. F. and Sambrook J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual:
Cold Spring Harbour Laboratory, New York

- Mansour S. L., Grodzicker T. and Tijan R. (1985)
An adenovirus vector system used to express polyoma virus tumor antigens :
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, pp 1359-1363
- Maxam A. M. and Gilbert W. (1980)
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages:
Methods Enzymology 65, pp 499 - 560
- Mills D. R. and Kramer F. R. (1979)
Structure-independent nucleotide analysis:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, pp 2232 - 2235
- Nowok J., Borgmeyer U., Püschel A. W., Rupp R. A. W. and Sippel A. E. (1985)
The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication
and the BK virus enhancer:
Nucl. Acid Res. 13, pp 2045 - 2061
- van Oostrum J. and Burnett R.M. (1985)
Molecular composition of the adenovirus type 2 virion:
Journal of Virology 56, pp 439 - 448
- Queen C. and Korn L. J. (1984)
A comprehensive sequence analysis program for the IBM personal computer:
Nucl. Acid Res. 12, pp 581 - 599
- Rawlins D. R., Rosenfeld P. J., Wides R. J., Challberg M- D. and Kelly T. J. Jr. (1984)
Structure and function of the adenovirus origin of replication:
Cell 37, pp 309 - 319
- Reiter T., Fütterer J., Weingärtner A. and Winnacker E.-L. (1980)
Initiation of adenovirus DNA:
Journal of Virology 35, pp 662 - 671
- Reiter T. (1980b)
Untersuchungen zur Replikation von Adenovirus Typ 2 DNA:
Doktorarbeit, biochemisches Institut der Universität München

- Rekosh D.M.K., Russel W.C., Bellet A.J.D. and Robinson A.J. (1977)
Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA:
Cell 11, pp 283 - 295
- Roizman B. and Jenkins F. J. (1985)
Genetic engineering of novel genomes of large DNA viruses:
Science 229, pp 1208 - 1214
- Rowe W.P., Huebner R.J., Gillmore L.K., Parrott R.H. and Ward T.G. (1953)
Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous
degeneration in tissue culture:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, pp 570 - 573
- Saito I., Oya Y., Yamamoto K., Yuasa T. and Shimojo H. (1985)
Construction of a nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobase Hepatitis B
virus DNA near the right end of its genome:
Journal of Virology, pp 711-719
- Sanger F., Nickler S. and Coulson A. R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 74, pp 5463-5467
- Schold M., Colombero A., Reyes A. A. and Wallace R. B. (1984)
Oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA templates and two primers
DNA 3, pp 469 - 477
- Sharp P. A., Moore C. and Haverty J. L. (1976)
The infectivity of adenovirus 5 DNA-protein-complex:
Virology 75, pp 442 - 456
- Smart J. E. and Stillman B. W. (1982)
Adenovirus terminal protein precursor:
The Journal of Biological Chemistry 257, pp 13499 - 13506

Southern E. M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis:

J. Mol. Biol. 98, pp 503 - 517

Tamanoi F. and Stillman B. W. (1983)

The origin of adenovirus DNA replication:

Current Topics in Microbiology and Immunology 109, 75 - 87

Trawers A. (1984)

Regulation by anti-sense RNA:

Nature 311, p 410

Varshavsky A. (1983)

Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate: a pleiotropic acting alarmon:

Cell 34, pp 711 - 712

Vieira J. and Messing J. (1982)

The pUC plasmid, an M13 mp7-derived system for insertional mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers:

Gene 19, pp 259-268

de Vries E., van Driel W., Tromp M., van Boom J. and van der Vliet P. (1985)

Adenovirus DNA replication *in vitro* : site-directed mutagenesis of the nuclear factor I binding site of the Ad2 origin:

Nucleic Acid Res. 13, pp 4935 - 4952

Vogt P. K. in Habel K. and Salzmann, N.P. (eds) (1969)

Fundamental techniques in virology:

Academic Press, NY/London, pp 316 - 326

Wallace R. B., Johnson M.J., Hirose T., Miyake T., Kawashima E. H. and Itakura K. (1981)

The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin-DNA:

Nucleic Acid Res. 9, pp 879-894

- Wallace R. B., Johnson M.J., Suggs S. V., Miyoski K., Bhatt R. and Itakura K. (1981b)
A set of synthetic oligodeoxynukleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR 322:
Gene 16, pp 21 - 26
- Weinberg G. and Hammerskjöld M. L. (1980)
Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA:
Nucl. Acid Res. 8, pp 253 - 264
- Weinmann-Dorsch C., Hedl A., Grummt I., Albert W., Ferdinand F., Friis R. R., Pierron G., Moll W. and Grummt F. (1984)
Drastic rise of intracellular Ap₄A correlates with onset of DNA synthesis in eukaryotic cells:
Europ. Journal Biochem. 138, pp 179 - 185
- Winnacker E.-L. (1984)
Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie :
Verlag Chemie Weinheim
- Werner T.B. (1981)
Die Ad 2 DNA Replikation unter dem Einfluß von Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-Tetraphosphat:
Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität München
- Yamada M., Lewis J. A. and Grodzicker T. 1985)
Overproduction of the protein product of a nonselected gene carried by an adenovirus vector:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 82, pp 3567-3571
- Zamecnik P. C., Rapaport E. and Baril E. F. (1982)
Priming of DNA synthesis by diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate with a double-stranded octadecamer as a template and DNA polymerase alpha:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, pp 1791 - 1794

Zinder N. D. and Boeke J. D. (1982)

The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA - a review:
Gene 19, pp 1 - 10

Zoller M.J. and Smith M. (1982)

Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and
general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA:
Nucleic Acid Res. 10, pp 6467-6500

Lebenslauf

Name:	Thomas Werner
Geburtsdatum:	05.07.1955
Geburtsort:	Mühldorf/Inn
Eltern:	Herbert Werner Brigitta Werner, geb. Radtke
Familienstand:	Ledig
1961 - 1965	Volkschule in Augsburg
1965 - 1974	Holbein-Gymnasium Augsburg (mathematisch-naturwissenschaftlich)
1974	Abitur
1974 - 1975	Grundwehrdienst in Landsberg/Lech
1975 - 1980	Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München (1978 Vordiplom)
Mai 1980	Diplom-Hauptprüfung (nach dem 9. Semester)
07.1980 - 04.1981	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München Thema: Die Ad2 DNA Replikation unter dem Einfluß von Diadenosin, 5',5'',P ¹ ,P ⁴ -Tetraphosphat
06.1981 - 09.1985	Doktorarbeit am selben Institut Thema: Untersuchungen am Adenovirus-Genom Neuere Aspekte zur Replikation und zur spezifischen Mutagenese

